

Rolle von CMKLR1 und dessen Liganden bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Rebekka Pohl aus Marktredwitz
im Jahr 2017

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2014 bis Juni 2017 in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 28.06.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Unterschrift:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungsverzeichnis**

vii

1	<u>Einleitung</u>	1
1.1	<u>Die Leber – Aufbau und Funktionen</u>	1
1.2	<u>Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)</u>	2
1.2.1	Definition	2
1.2.2	Pathogenese der NAFLD	4
1.2.2.1	Insulin-Resistenz in der Pathogenese der NAFLD	4
1.2.2.2	Lipide in der Pathogenese der NAFLD	5
1.2.2.3	Oxidativer Stress in der Pathogenese der NAFLD	6
1.2.2.4	Die <i>unfolded protein response</i> in der Pathogenese der NAFLD	7
1.2.2.5	Das Darmmikrobiom in der Pathogenese der NAFLD – die Darm-Leber-Achse	7
1.2.2.6	Immunzellen in der Pathogenese der NAFLD	8
1.2.3	Fibrose und Zirrhose in der NAFLD	10
1.2.4	Diagnose und Therapie der NAFLD	12
1.2.4.1	Diagnose der NAFLD	12
1.2.4.2	Therapie der NAFLD	12
1.2.4.2.1	Veränderung des Lebensstils und Gewichtsreduktion	12
1.2.4.2.2	Antidiabetika als Therapie in der NAFLD	13
1.2.4.2.3	Lipidsenker als Therapie in der NAFLD	13
1.2.4.2.4	Antioxidantien als Therapie in der NAFLD	13
1.2.4.2.5	Entzündungshemmende Medikamente als Therapie in der NAFLD	14
1.2.4.2.6	Probiotika als Therapie in der NAFLD	14
1.2.4.2.7	Agonisten nukleärer Rezeptoren als Therapie in der NAFLD	14
1.3	<u>CMKLR1 und seine Liganden</u>	15
1.3.1	CMKLR1 (<i>Chemokine-like receptor 1</i>)	15
1.3.2	CMKLR1-Ligand Chemerin	16
1.3.2.1	Expression und Prozessierung von Chemerin	16
1.3.2.1.1	Expression von Chemerin	16
1.3.2.1.2	Prozessierung von Chemerin	17
1.3.3	Weitere CMKLR1-Liganden: Chemerin-C15-Peptid und Resolvin E1	18
1.3.3.1	Chemerin-C15-Peptid	18
1.3.3.2	Resolvin E1	18
1.3.4	Funktionen von CMKLR1 und seinen Liganden	18
1.3.4.1	Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden in Entzündungen	19
1.3.4.1.1	Pro-inflammatorische Rolle des CMKLR1/Chemerin-Systems	19
1.3.4.1.2	Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden	20
1.3.4.1.2.1	Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und Chemerin-Peptiden	20
1.3.4.1.2.2	Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und Resolvin E1	21

1.3.4.2	Rolle von Chemerin als Adipokin und der systemische Chemerinspiegel in der Adipositas	21
1.3.4.3	Rolle von CMKLR1 und Chemerin in der Glukose- und Insulin-Regulation	22
1.4	<u>Ziel dieser Arbeit</u>	22
2	<u>Material und Methoden</u>	24
2.1	<u>Material</u>	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3	Kit-Systeme	26
2.1.4	Chemikalien	27
2.1.5	Puffer und Lösungen	29
2.1.5.1	Puffer und Lösungen für Arbeiten mit DNA	29
2.1.5.2	Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	29
2.1.5.2.1	Puffer und Lösungen für die Extraktion von Proteinen	29
2.1.5.2.2	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	30
2.1.5.2.3	Puffer und Lösungen für Western Blotting	31
2.1.5.2.4	Puffer und Lösungen für ELISAs	32
2.1.6	Medien zur Kultivierung von Prokaryoten und Eukaryoten	32
2.1.6.1	Medien zur Kultivierung und Selektion von Prokaryoten (<i>E. coli</i>)	32
2.1.6.2	Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen	32
2.1.7	Enzyme	33
2.1.8	Antikörper	33
2.1.8.1	Primäre Antikörper	33
2.1.8.2	Sekundäre Antikörper	33
2.1.9	Oligonukleotide	33
2.1.9.1	Oligonukleotide für die mRNA-Expressionsanalyse mit dem LightCycler®	33
2.1.9.1.1	Oligonukleotide für die Expressionsanalyse muriner Gene	33
2.1.9.1.2	Oligonukleotide für die Expressionsanalyse humaner Gene	34
2.1.9.2	Oligonukleotide für die Klonierung von murinem Chemerin162 in pHTN-HaloTag®-CMV-neo	34
2.1.9.3	Oligonukleotide für die Sequenzierung des Chemerin162-Inserts in pHTN-HaloTag®-CMV-neo	34
2.1.10	Organismen	34
2.2	<u>Methoden</u>	36
2.2.1	Humane Proben	36
2.2.1.1	Humane Leberproben zur Analyse der Chemerin-mRNA-Expression in der NAFLD	36
2.2.1.2	Humane Blutproben zur Analyse des systemischen Chemerinspiegels im Serum in der NAFLD	37
2.2.2	Arbeiten mit Versuchstieren	38
2.2.2.1	Versuchstiere und Präparation: Wildtyp C57BL/6-Mäuse	38
2.2.2.2	Tiermodelle: Diät-induzierte Fettlebererkrankung bei C57BL/6	38

2.2.2.2.1	Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät)	39
2.2.2.2.2	Atherogene Paigendiät	39
2.2.2.3	AAV8-vermittelte hepatische Überexpression von Chemerin162 und Chemerin156 in C57BL/6-Mäusen	40
2.2.3	Arbeiten mit Zellen	40
2.2.3.1	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	40
2.2.3.1.1	Kultivierung der Zelllinien LX-2, HepG2 und Hepa1-6 in der Zellkultur	40
2.2.3.1.2	Aussäen von Zellen für Stimulations- und Transfektionsversuche	41
2.2.3.1.3	Transfektion von Hepa1-6 mit Lipofectamin3000® zur Chemerin162-Überexpression	42
2.2.3.1.4	Stimulation von Zellen	42
2.2.3.1.4.1	Stimulation von Hepa1-6-Zellen mit LPS	42
2.2.3.1.4.2	Stimulation von HepG2- und LX-2-Zellen mit T0901317, GW4064 und Rosiglitazon	42
2.2.3.1.5	Bestimmung der Zytotoxizität mittels Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay)	43
2.2.3.2	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	43
2.2.3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	43
2.2.3.2.2	Transformation kompetenter DH5α-Zellen mittels Hitzeschock	43
2.2.3.2.3	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> im kleinen Maßstab (Miniprep)	44
2.2.3.2.4	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> in größerem Maßstab (Midiprep)	45
2.2.4	Arbeiten mit Nukleinsäuren	45
2.2.4.1	Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure mit dem NanoDrop	45
2.2.4.2	Arbeiten mit DNA	46
2.2.4.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.2.4.2.2	Agarosegelelektrophorese	46
2.2.4.2.3	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	47
2.2.4.2.4	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	47
2.2.4.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau	48
2.2.4.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase	48
2.2.4.2.7	Sequenzierung bei GeneArt	48
2.2.4.3	Arbeiten mit RNA	49
2.2.4.3.1	Isolation von RNA aus Zellen und Geweben mit TRIzol®	49
2.2.4.3.2	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	50
2.2.4.3.3	Real Time-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)	50
2.2.4.3.4	Primer-Test für die Genexpressionsanalyse mittels rt-PCR	52
2.2.5	Arbeiten mit Proteinen	53
2.2.5.1	Proteinextraktion aus Zellen mit RIPA-Puffer	53
2.2.5.2	Proteinextraktion aus Geweben mit RIPA-Puffer	53
2.2.5.3	Quantifizierung von Proteinen mittels BCA-Assay	54
2.2.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.2.5.5	Western Blot	55
2.2.5.6	Coomassie-Färbung	56
2.2.5.7	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	56
2.2.5.8	Immunpräzipitation von Chemerin-Protein aus Leberproteinlysats für die Massenspektrometrie	57
2.2.5.9	Messung der Bioaktivität von Chemerin im Serum mittels Tango-Assay	59

2.2.6	Messung von Triglyzeriden in Seren und Leberlysaten	59
2.2.7	Messung von Cholesterin in Seren und Leberlysaten	59
2.2.8	Messung von Glukose in Seren	60
2.2.9	Histologische Untersuchung von Leberschnitten mit Hämalaun & Eosin-Färbung	60
2.2.10	Statistische Auswertungen	61
3	<u>Ergebnisse</u>	62
3.1	<u>Chemerin in der humanen nicht-alkoholischen Steatohepatitis</u>	62
3.1.1	Untersuchung der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression in der humanen NAFLD	63
3.1.2	Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD	65
3.1.3	Einfluss von Chemerin auf die Regulation von Hepcidin und FGF21 in primären humanen Hepatozyten	66
3.1.4	Einfluss von Regulatoren der hepatischen Lipid- und Glukose-Homöostase auf die Expression von Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	67
3.1.4.1	Einfluss des LXR-Agonisten T0901317 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	67
3.1.4.2	Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	69
3.1.4.3	Einfluss von Rosiglitazon auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	70
3.2	<u>Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid haben keine positive Auswirkung auf die murine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)</u>	72
3.2.1	Mäuse auf Paigendiät entwickeln eine NASH	72
3.2.2	Untersuchung des Einflusses von RvE1 und C15 auf Körper-, Leber-, Milz- und Fettgewebsgewichte bei Paigendiät	75
3.2.3	Einfluss von RvE1 und C15 auf verschiedene Serum- und Leberparameter	77
3.2.4	Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression inflammatorischer Markergene	78
3.2.5	Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression fibrotischer Markergene	78
3.2.6	Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1	80
3.2.7	Assoziation von hepatischer Chemerin- und CMKLR1-Expression mit NASH-Parametern bei Behandlung mit RvE1 und C15	81
3.3	<u>Hepatische Überexpression von Chemerin im murinen NASH-Modell</u>	83
3.3.1	Mäuse auf MCD-Diät entwickeln eine NASH	83
3.3.2	AAV-vermittelte hepatische Chemerin162-Überexpression im murinen NASH-Modell	85
3.3.2.1	Analyse der hepatischen Chemerin162-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene	86
3.3.2.2	Analyse des Körper- und Organgewichts bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH	87
3.3.2.3	Einfluss von Chemerin162-Überexpression auf Serumparameter und Leberlipide in der murinen NASH	88
3.3.2.4	Hepatische Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH	90
3.3.2.5	Hepatische Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH	91

3.3.2.6	Hepatische Expression von Immunzellmarkern bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH	92
3.3.2.7	Messung der Chemerin-Aktivität im Serum bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH mittels Tango-Assay	93
3.3.2.8	Massenspektrometrische Analyse der Chemerin-Isoformen im Leberlysate bei Überexpression von Chemerin162 in der murinen NASH	95
3.3.3	AAV-vermittelte hepatische Chemerin156-Überexpression im murinen NASH-Modell	96
3.3.3.1	Analyse der hepatischen Chemerin156-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene	96
3.3.3.2	Analyse des Körper- und Organgewichts bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH	97
3.3.3.3	Einfluss von Chemerin156-Überexpression auf Serumparameter und Leberlipide in der murinen NASH	100
3.3.3.4	Hepatische Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH	101
3.3.3.5	Hepatische Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH	101
3.3.3.6	Hepatische Expression von Immunzellmarkern bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH	102
3.3.3.7	Messung der Chemerin-Aktivität im Serum bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH mittels Tango-Assay	103
3.3.3.8	Massenspektrometrische Analyse der Chemerin-Isoformen im Leberlysate bei Überexpression von Chemerin156 in der murinen NASH	104
3.4	<u>Auswirkungen der Überexpression von Chemerin auf die NAFLD <i>in vitro</i>: Transfektion von pHTN-Chemerin162 in Hepa1-6 mit anschließender LPS-Stimulation</u>	105
3.4.1	Transfektion von pHTN-Chemerin162 und Überexpression von Chemerin <i>in vitro</i>	105
3.4.2	Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression bei einem NAFLD-Modell <i>in vitro</i>	107
3.4.3	Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression bei einem NAFLD-Modell <i>in vitro</i>	108
4	<u>Diskussion</u>	110
4.1	<u>Chemerin in der humanen nicht-alkoholischen Steatohepatitis</u>	110
4.1.1	Untersuchung der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression in der humanen NAFLD	110
4.1.2	Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD	111
4.1.3	Einfluss von Chemerin auf die Regulation von Hepcidin und FGF21 in primären humanen Hepatozyten	112
4.1.4	Einfluss von Regulatoren der hepatischen Lipid- und Glukose-Homöostase auf die Expression von Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	113
4.1.4.1	Einfluss des LXR-Agonisten T0901317 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	113
4.1.4.2	Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	113
4.1.4.3	Einfluss von Rosiglitazon auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen	114

4.2	<u>Wirkung von Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid in der murinen nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH)</u>	114
4.2.1	Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid haben keine positive Auswirkung auf die murine NASH	114
4.2.2	Resolvin E1 erniedrigt das Nüchterninsulin	116
4.2.3	Chemerin und CMKLR1 in der NASH-Leber	117
4.3	<u>Hepatische Überexpression von Chemerin im murinen NASH-Modell</u>	118
4.3.1	Die hepatische Überexpression von Chemerin156 führt zu einem erhöhten Milz- und Lebergewicht in der murinen NASH	118
4.3.2	Die hepatische Überexpression von Chemerin162 führt zur Reduktion der Entzündung und Fibrose in der murinen NASH	119
4.3.3	Die hepatische Überexpression von Chemerin162 führt zur Erhöhung von M2-Makrophagen in der NASH-Leber	120
4.3.4	Chemerin-Bioaktivität im Serum bei hepatischer Chemerin-Überexpression in der murinen NASH	121
4.3.5	Massenspektrometrische Analyse der hepatischen Chemerin-Isoformen bei hepatischer Chemerin-Überexpression in der murinen NASH	122
4.4	<u>Auswirkungen der Überexpression von Chemerin auf die NAFLD in vitro: Transfektion von pHTN-Chemerin162 in Hepa1-6 mit anschließender LPS-Stimulation</u>	122
5	<u>Zusammenfassung</u>	123
6	<u>Publikationen und Kongressbeiträge</u>	125
6.1	<u>Publikationen</u>	125
6.1.1	Erstautorenschaften	125
6.1.2	Koautorenschaften	125
6.2	<u>Kongressbeiträge</u>	127
6.2.1	Vorträge	127
6.2.2	Poster	127
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	130

Abkürzungsverzeichnis

18S rRNA	18S ribosomale RNA
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
ALAT	Alanintransaminase
alpha-SMA/ α -SMA	<i>alpha-smooth muscle actin</i>
Amp	Ampicillin
Apm	Adiponectin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
au	<i>arbitrary unit</i>
auc	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BAT	<i>brown adipose tissue</i> (braunes Fettgewebe)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BMI	Body-Mass-Index [kg/m^2]
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C15	Chemerin-C15-Peptid
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CCRL2	<i>C-C motif chemokine receptor like 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CMKLR1	<i>Chemokine receptor-like 1</i>
Col1a1	Collagen Typ 1 alpha 1
Cp	crossing point
C-terminal	Carboxy-terminal
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Da	Dalton
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-Ham's F12 Nutrient Mixture</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
epi	epididymal
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat., und andere)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FFS	freie Fettsäure
FS	Fettsäure
g	Erdbeschleunigung (als Zentrifugationseinheit)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR1	<i>G protein-coupled receptor 1</i>

HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HFD	Hochfettdiät
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merrettichperoxidase)
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin 6
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MCD-Diät	Methionin-Cholin-defiziente Diät
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.s.	nicht signifikant
NAFLD	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NCS	<i>newborn calf serum</i> (Neugeborenes Kälberserum)
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
p.A.	<i>pro analysi</i> (lat., für die Analyse)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real Time - Polymerasekettenreaktion
ren	perirenal
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
RvE1	Resolvin E1
S	Svedberg; nicht-metrische Einheit der Sedimentationsrate
s	Sekunde
sc	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>

T2D	Typ-2-Diabetes
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween®20
TEMED	Tetramethylenethyldiamin
TG	Triglycerid
TGFbeta/β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNFalpha/α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>unit</i>
ÜE	Überexpression
uni	universe
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolet
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ω-3-PUFA	Omega-3-mehrfach ungesättigte Fettsäure

1 Einleitung

1.1 Die Leber – Aufbau und Funktionen

Als zweitgrößtes Organ nach der Haut und größte Drüse des menschlichen Körpers besitzt die Leber eine Vielzahl an Aufgaben, die kritisch für die Aufrechterhaltung der Funktion vieler anderer Organe sind.

Eine der Hauptaufgaben der Leber ist die Synthese verschiedener Moleküle, unter anderem von Cholesterin [1] und dessen Derivaten, den Gallensäuren [2], von Bluteiweißen wie z. B. Albumin [3] und von Fettsäuren [4]. Zudem findet in der Leber auch die Glukoneogenese statt, bei der aus Kataboliten anderer Stoffwechselwege Glukose hergestellt wird [5]. Glukose wird in der Leber als Glykogen gespeichert, das bei Bedarf zur Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels wieder in Glukose gespalten und ins Blut abgegeben werden kann [6].

Die Leber ist auch für den Abbau von Erythrozyten [7] und die Entgiftung des Körpers durch die Oxidation und den Metabolismus von Medikamenten und schädlichen Stoffen wie zum Beispiel Ammoniak, die beim Stoffwechsel anfallen, zuständig [8].

Die Leber ist in vier ungleich große Lappen unterteilt, und wird über die Leberarterie und die Pfortader mit Blut versorgt. Dabei versorgt die Leberarterie das Organ mit sauerstoffreichem Blut vom Herzen, während die Pfortader sauerstoffarmes, aber nährstoffreiches Blut von den gastrointestinalen Organen in die Leber transportiert [9]. In der Leber verzweigen sich die Gefäße stark, und vereinen sich schlussendlich zur Lebervene, die das Blut wieder dem Körperkreislauf zuführt [10].

Die Leberlappen an sich bestehen auf zellulärer Ebene aus hexagonalen Leberläppchen (s. Abb. 1), bei denen Parenchymblöcke aus Hepatozyten (sogenannte Leberzellbalken) radial um eine Zentralvene angeordnet sind [11]. Zwischen den Leberzellbalken befinden sich die Lebersinusoide, in denen sich das Blut aus Leberarterie und Pfortader vermischt und zur Zentralvene befördert wird (s. Abb. 1). Die Sinusoide sind mit Endothelzellen ausgekleidet und weisen Fenestrierungen auf (s. Abb. 1), die den Übertritt von Molekülen aus dem oder in das Lumen der Sinusoide erlauben [12]. In den Sinusoiden befinden sich die sogenannten Kupfferzellen (s. Abb. 1; nach ihrem Entdecker Karl Wilhelm Kupffer), welche als residente Makrophagen der Leber die erste Verteidigungslinie gegen potentielle immunoreaktive Partikel und Substanzen, die vom gastrointestinalen System kommen, darstellen [13, 14]. Im perisinusoidalen Raum (oder Raum von Disse) zwischen den Leberzellbalken und den Sinusoiden befinden sich die hepatischen Sternzellen (s. Abb. 1), die im nicht-aktivierten Zustand hauptsächlich als Vitamin A-Speicher dienen [15].

Gallensäure wird in den Hepatozyten synthetisiert, sekretiert und sammelt sich entlang lateraler Vertiefungen der Hepatozyten am Rande der Leberläppchen in Gallenkapillaren (s. Abb. 1) [2]. Durch Vereinigung der Gallenkapillaren entsteht der gemeinsame Lebergang, der mit dem von der Gallenblase kommenden Gallenblasengang einen gemeinsamen Gang bildet, welcher letztendlich in das Duodenum mündet [10]. Auf diese Weise kann in der Leber synthetisierte Gallensäure in der Gallenblase gespeichert werden oder direkt zur Verdauung im Zwölffingerdarm verwendet werden [2, 16].

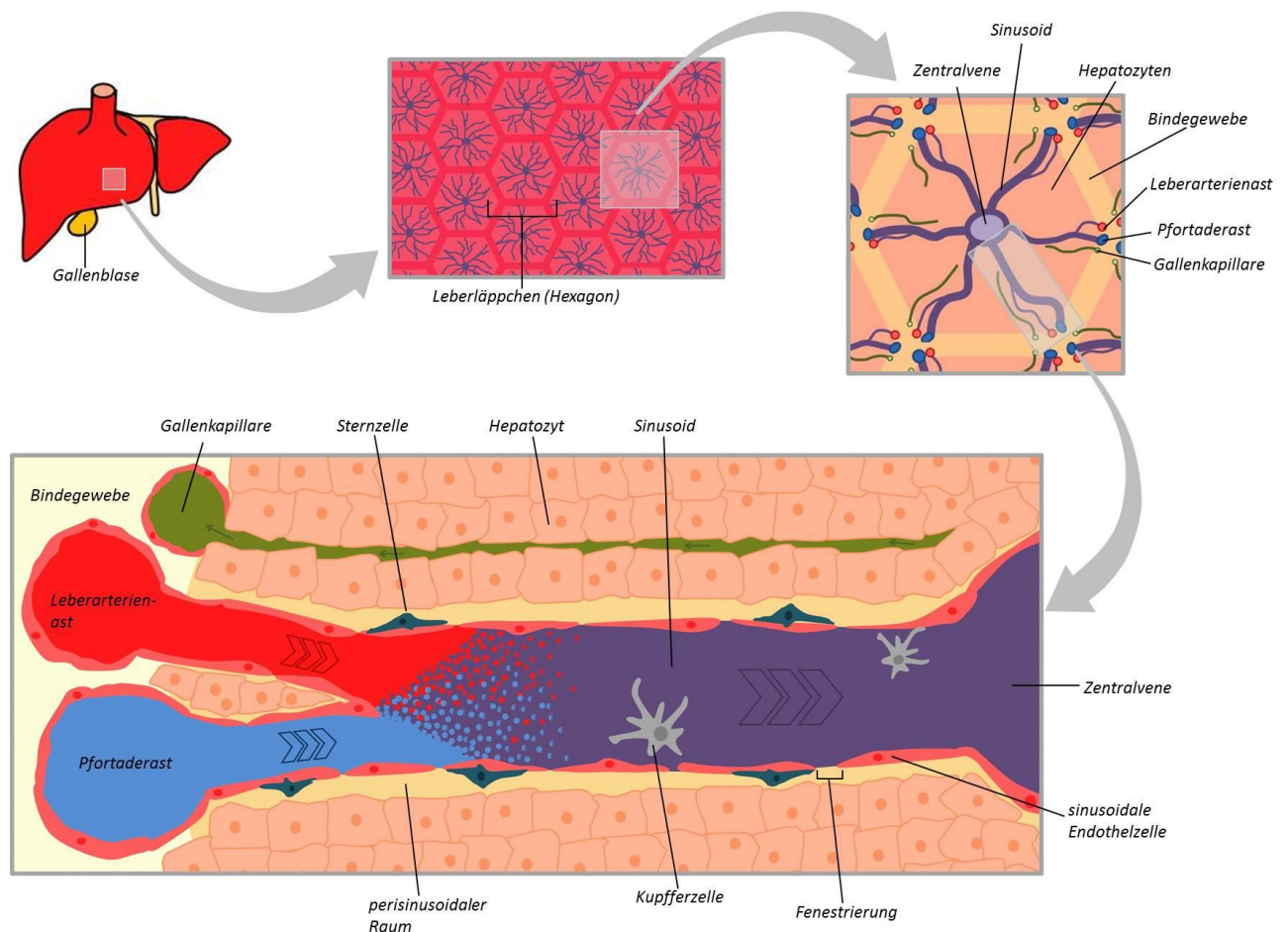


Abbildung 1 Aufbau der funktionellen Einheiten der Leber, den Leberläppchen (nach [17-19]). Die Leberläppchen bestehen aus Leberläppchen, die eine hexagonale Form besitzen und zum Großteil aus Hepatozyten aufgebaut sind. Äste der Leberarterie und Pfortader vereinigen sich im Längchen zu Sinusoiden, in welchen das Blut zur Zentralvene fließt. Die Sinusoide weisen Fenestrierungen in ihrem Endothel auf und beherbergen Kupfferzellen, die residenten Makrophagen der Leber. Zwischen dem Sinusoid und den angrenzenden Hepatozyten befindet sich der perisinusoidale Raum (oder Raum von Disse), in dem sich die hepatischen Sternzellen befinden und der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfindet. Von Hepatozyten produzierte Gallensäure wird sekretiert und sammelt sich entlang der Vertiefungen der Hepatozyten am Rande der Längchen in Gallenkapillaren.

1.2 Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

1.2.1 Definition

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) ist heutzutage weltweit die Hauptursache chronischer Lebererkrankungen [20, 21]. Da die NAFLD meist bei

übergewichtigen Personen auftritt [22] und ihre Pathogenese durch die Insulin-Resistenz gefördert wird [23], könnte man diese Erkrankung als die hepatische Ausprägung des weltweit zunehmenden Übergewichts bezeichnen.

Die NAFLD wird als Zustand übermäßiger Fettakkumulation in der Leber definiert [24], die nicht durch Alkoholabusus oder Medikamente bedingt ist [25].

Dabei umfasst die Bezeichnung NAFLD ein Krankheitsspektrum, das von der simplen Hepatosteatoe mit exzessiver Speicherung von Triglyzeriden in der Leber („Fettleber“) bis hin zur Hepatosteatitis mit Entzündung und damit einhergehender Schädigung der Hepatozyten (nicht-alkoholische Steatohepatitis, NASH) reicht (s. Abb. 2) [26]. Zusätzlich zur Entzündung der Leber kann es bei der NASH zur Fibrose kommen, bei der durch die übermäßige Produktion extrazellulärer Matrixproteine als Wundheilungs-Antwort die Leber zunehmend vernarbt [27]. Die NASH ist eine progressive Krankheit und entwickelt sich bei etwa 20% der Patienten zur Leberzirrhose (s. Abb. 2), bei der die Gewebearchitektur durch Bildung regenerativer Knötchen und steifem Narbengewebe beeinträchtigt ist, wodurch auch die Funktionen der Leber zunehmend eingeschränkt werden [27, 28]. Zusätzlich stellt die Hepatosteatitis neben der Leberzirrhose einen Risikofaktor für die Entwicklung maligner hepatozellulärer Karzinome dar (s. Abb. 2) [29, 30].

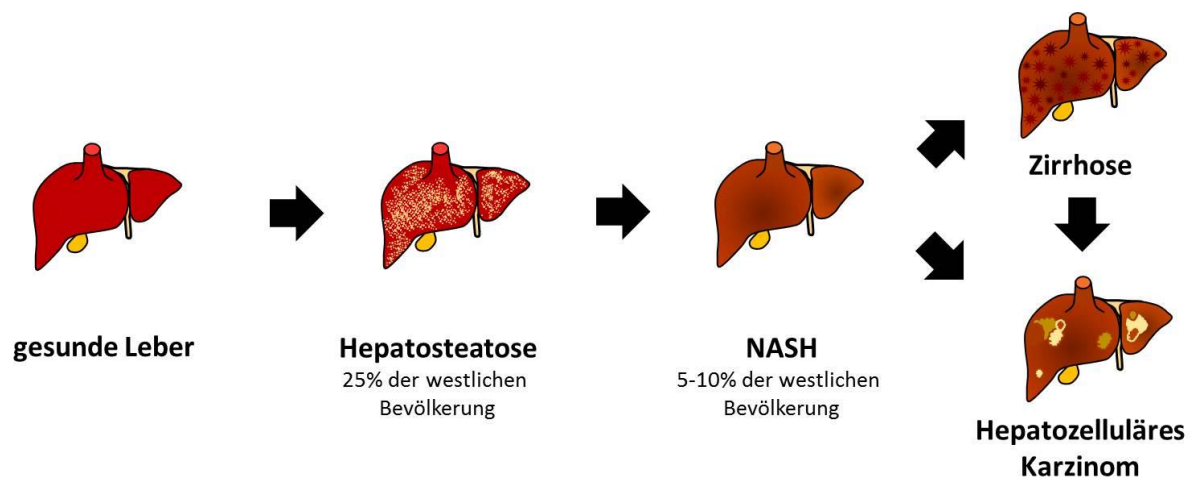


Abbildung 2 Die Progression der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (nach [31]). Ein Viertel der westlichen Bevölkerung hat eine Fettleber, die sich zur progressiven nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) mit hepatozellulärer Entzündung und Fibrose weiterentwickeln kann. Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung kann es zur Leberzirrhose kommen, bei der die Leberarchitektur stark beeinträchtigt ist und die Hepatozytenfunktion sehr reduziert ist, sodass es zu einem Funktionsverlust der Leber kommen kann. Die NASH, aber vor allem die NAFLD-bedingte Leberzirrhose sind Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms.

Die NAFLD und vor allem die NASH erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Erkrankungen zu versterben, die mit der primären Lebererkrankung kausal verknüpft sind [32], wie Leberversagen oder ösophagiale Varizenblutung, die bei der Leberzirrhose durch die portale Hypertension bedingt ist.

Haupttodesursachen der NAFLD-Patienten sind jedoch Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder maligne Tumore [20].

Übergewicht und Insulin-Resistenz sind gemeinsame Risikofaktoren für die NAFLD und kardiovaskuläre Erkrankungen, erklären aber nur zum Teil das erhöhte Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen in der NAFLD [33]. Die durch die Insulin-Resistenz bedingte Hyperinsulinämie fördert das Wachstum verschiedener Tumorzellen [34, 35].

1.2.2 Pathogenese der NAFLD

Zur Pathogenese der NAFLD wurde vor rund zwanzig Jahren die „*Two-hit*-Theorie“ aufgestellt, gemäß derer die Akkumulation von Lipiden in der Leber als erster schädigender Faktor („*hit*“) auftritt. Dies führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Leber gegenüber weiteren schädigenden Faktoren wie oxidativem Stress oder pro-inflammatorischen Zytokinen, was schließlich in der Entwicklung einer NASH resultiert [36].

Diese Theorie scheint aufgrund der neueren Erkenntnisse zu einfach, um die komplexen Vorgänge, die zur Entstehung und der Progression der NAFLD beitragen, zu erklären.

Als komplexe Erkrankung ist der Krankheitsverlauf der NAFLD abhängig von metabolischen, genetischen und Umweltfaktoren [20, 37], und auch die mikrobielle Darmflora scheint eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen [38]. Weiterhin ist auch die bei der *Two-hit*-Theorie angenommene Leber-autonome Dysfunktion als NASH-Ursache obsolet, da auch das Fettgewebe [39] und die Skelettmuskelmasse [40] zur Lebererkrankung beitragen.

Im Lichte dessen wird die Entstehung und Progression der NAFLD als Ergebnis des teilweise parallelen Auftretens mehrerer schädigender Faktoren wie Insulin-Resistenz, Lipidakkumulation und oxidativem Stress angesehen („*multiple hits*“) [37, 41].

1.2.2.1 Insulin-Resistenz in der Pathogenese der NAFLD

Als initiiierende Ereignisse in der NAFLD werden Fettleibigkeit und eine damit einhergehende Insulin-Resistenz der Leber und peripherer Organe und Gewebe angesehen [42, 43].

Normalerweise wird Insulin von den β -Zellen des Pankreas in Abhängigkeit vom Glukose-Metabolismus des Körpers freigesetzt und senkt durch Stimulation der Glukoseaufnahme der Zellen den Blutzuckerspiegel [44]. In den Zellen, vor allem in der Leber und im Muskel, wird die Glukose dann zur Speicherung in Glykogen umgewandelt oder zur Energiegewinnung durch die Glykolyse abgebaut [5, 45].

Bei der Insulin-Resistenz kommt es zu einer Störung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme aus dem Blut, dem Glukose-Metabolismus und der Speicherung als Glykogen in den Körperzellen. Die

Pathogenese der Insulin-Resistenz und die betroffenen molekularen Mechanismen sind sehr komplex und Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Unumstritten ist, dass die Insulin-Resistenz eng mit Übergewicht, der Entstehung von Typ-2-Diabetes und der NAFLD verbunden ist [46].

Bei der Entstehung der hepatischen Insulin-Resistenz scheint die Lipotoxizität akkumulierter Lipide und ihrer Metabolite eine große Rolle zu spielen. Diacylglyceride (DAG) sind Intermediate beim Fettsäuremetabolismus zu Triacylglyceriden, und blockieren bei Akkumulation im Zytosol der Hepatozyten die Funktion der Insulinrezeptoren [47, 48].

Bei Übergewicht und Fettleibigkeit wird per Definition überschüssige Energie in Form von Fett in Adipozyten gespeichert, welche dabei ihr Volumen um ein Vielfaches vergrößern können [49, 50]. Diese Hypertrophie stellt eine Stresssituation für die Adipozyten dar [51, 52], die darauf unter anderem mit der Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine und Adipokine reagieren [53, 54]. Zudem ist die Adipositas mit einer hohen Belastung zellulärer Organellen wie des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien assoziiert [55, 56], und führt zu vermehrtem oxidativem Stress in der Zelle. Dadurch werden verschiedene Signalwege aktiviert, die wiederum zur Synthese von inflammatorischen Zytokinen führen, wodurch auch Immunzellen zu den überlasteten Adipozyten rekrutiert werden [57, 58].

Pro-inflammatorische Zytokine wie *tumor necrosis factor* (TNF) und Interleukin-6 (IL-6) beeinträchtigen die Differenzierung und Lipidakkumulation von Adipozyten [59]. Diese Zytokine vermindern die Insulin-induzierte Speicherung von Triglyceriden [60, 61] und fördern gleichzeitig die Lipolyse in den Adipozyten [57]. All das führt schließlich zur Ablagerung von ektopischem Fett in nicht-adipösem Gewebe wie Leber, Skelettmuskeln oder dem Herzen [52]. Dieses ektope Fett ist dysfunktional und führt durch die konstitutiv erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-6, TNF und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) zu einem chronischen Entzündungszustand und der Beeinträchtigung des Insulin-Signallings in diesen Geweben [62, 63]. In hypertrophen Adipozyten wird auch weniger Adiponectin synthetisiert, das normalerweise Zellen gegenüber Insulin sensibilisiert [64].

1.2.2.2 Lipide in der Pathogenese der NAFLD

Der Großteil des hepatischen Fettes in der NAFLD gelangt als freie Fettsäuren im Plasma über den Blutkreislauf in die Leber. Generell ist der Level der freien Fettsäuren im Blut bei Adipositas erhöht [65], was auch an der Dysregulation der Lipolyse im peripherem Fettgewebe und der damit einhergehenden Abgabe der Fettsäuren ins Blut liegt [66].

Die durch die Insulin-Resistenz verursachte verringerte Aufnahme der Glukose aus dem Blut in die Körperzellen führt zur Hyperglykämie, die der Körper durch erhöhte Insulin-Produktion und -

Sekretion der pankreatischen β -Zellen zu regulieren versucht. Die daraus resultierende Hyperinsulinämie führt zusammen mit der Hyperglykämie zur Aktivierung der *de novo* Lipogenese in der Leber [67, 68]. Somit ist in der Insulin-resistenten Leber dieser Stoffwechselweg sogar aktiviert und trägt hauptsächlich zur hepatischen Steatose bei [69].

Ein kleinerer Teil des hepatischen Fettes in der NAFLD resultiert aus der Nahrung, wobei die Fette entweder von Chylomikronen als freie Fettsäuren direkt ins Blut abgegeben werden und über die Pfortader in die Leber gelangen, oder als Bestandteil von Chylomikronen-Remnants von der Leber aufgenommen werden [70].

Zur weiteren Akkumulation der hepatischen Lipide in der NAFLD tragen zudem der verminderte Abbau von Fettsäuren durch die β -Oxidation in Mitochondrien [71] und die Beeinträchtigung der Bildung von *very-low-density lipoprotein* (VLDL)-Partikeln bei Hyperinsulinämie [72], die Lipide aus der Leber in die Körperperipherie transportieren, bei.

1.2.2.3 Oxidativer Stress in der Pathogenese der NAFLD

Die Lipotoxizität der akkumulierten Fettsäuren und ihrer Metabolite in den Hepatozyten führt unter anderem zur generellen Dysfunktion der Mitochondrien, was in oxidativem Stress und der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) resultiert [73, 74]. Zudem kommt es dabei in den Mitochondrien zu morphologischen und funktionellen Veränderungen wie dem Abbau mitochondrieller DNA und der Schädigung der Atmungskette [75], die zur Dysfunktion der Mitochondrien beitragen.

Das Vorhandensein von ROS führt durch die Depletion von Energieträgern wie ATP und anti-oxidantischen Stoffen wie Glutathion, und durch die Beschädigung von DNA, Proteinen und Lipiden zur Vergrößerung des oxidativen Stresses in der Zelle, der zum Zelltod führen kann [76]. Weiterhin greifen ROS durch Veränderung der Genregulation und Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen in das Insulin-Signalling von Zellen ein, was zur Insulin-Resistenz der Zellen beiträgt [77].

Zusätzlich kann das Vorhandensein von ROS in Hepatozyten auch die VLDL-Sekretion durch Stimulation der Degradation von Apolipoproteinen inhibieren, was zur Akkumulation von Triglyzeriden führt [78]. Auch werden durch ROS in Kupferzellen und Hepatozyten c-Jun N-terminale Kinasen (JNK)-Signalkaskaden stimuliert, die durch Induktion der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine zur Rekrutierung von Immunzellen führen, und die Apoptose dieser Zellen auslösen können [79].

1.2.2.4 Die *unfolded protein response* in der Pathogenese der NAFLD

Hyperglykämie, Lipid-Überladung und die mitochondrielle Schädigung führen zu einer vermehrten Belastung des endoplasmatischen Retikulums (ER), welches bei Adipositas generell höher beansprucht wird [80]. Dies kann zur Dysfunktion führen, bei der die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Lumen des ER die *unfolded protein response* (UPR) auslöst, wobei verschiedene Signalwege zur Kompensation aktiviert werden.

Unter anderem wird dabei durch Inhibition der weiteren Proteintranslation, durch die erhöhte Degradation ungefalteter Proteine und erhöhte Synthese von Chaperonen, die für die korrekte Faltung von translatierten Proteinen zuständig sind, versucht, die ER-Homöostase wiederherzustellen. Generell ist das Ziel der UPR durch Aufrechterhaltung der ER-Funktionalität das Überleben der Zelle zu sichern, doch je nach Ausmaß und Dauer der Schäden kann durch die UPR die Apoptose ausgelöst werden, um irreversibel geschädigte Zellen zu beseitigen [81, 82].

Im Rahmen der UPR werden auch durch die Aktivierung der JNK- und *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB)-Signalwege pro-inflammatorische Signalkaskaden induziert, die durch Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine und damit einhergehender Rekrutierung von Immunzellen zur Entstehung der Inflammation der Hepatozyten beitragen [83]. Die Aktivierung von JNK-Signalwegen ist mit der Störung des Insulin-Signallings und der Entwicklung von Typ-2-Diabetes assoziiert [84]. Zudem führt UPR auch zur Aktivierung des Lipogenese-Stimulators *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP)-1c [85]. Dies trägt weiter zur intrahepatischen Fettakkumulation und zur hepatischen Insulin-Resistenz bei.

1.2.2.5 Das Darmmikrobiom in der Pathogenese der NAFLD – die Darm-Leber-Achse

Bei den in den letzten Jahren zunehmenden Studien zur Untersuchung des Mikrobioms des Darms wurde auch die Beziehung der Darmflora zur Pathogenese und Progression der NAFLD näher untersucht, und ein enges Zusammenspiel zwischen Darm und Leber, die sogenannte „Darm-Leber-Achse“, postuliert [86].

Bei NAFLD-Patienten wurde in Studien generell eine Dünndarmfehlbesiedelung durch übermäßigen Mikrobenbewuchs [87] und eine erhöhte Darmpermeabilität festgestellt, wobei es durch beschädigte *tight junctions* zwischen Darmepithelzellen zur unkontrollierten Passage von Partikeln, Mikroorganismen oder Toxinen ins Blut kommen kann [88, 89]. Da bei der hepatischen Blutversorgung etwa 75-80% des Blutes über die Pfortader von den unpaaren Organen aus dem Bauchraum kommen [90], stellt die Leber sozusagen eine erste Verteidigungslinie gegen vom Darm kommende Mikrobenpartikel, bakterielle Toxine wie Lipopolysaccharide (LPS) und Mikroben dar [91]. Als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien spielt LPS bei der Pathogenese der NASH durch

Auslösung einer Entzündungsantwort eine Rolle, wobei die Synthese und Sekretion proinflammatorischer Zytokine erhöht wird und Immunzellen den Entzündungsherd infiltrieren [92]. Dies führt im Zusammenhang mit der erhöhten Darmpermeabilität und der Dünndarmfehlbesiedelung in der NAFLD zur chronischen Entzündung und kann sich über größere Teile der Leber ausbreiten.

Schon in den dreißiger Jahren des 19. Jahrhunderts wurde der Einfluss des primären Alkohols Cholin auf die Fettleber herausgefunden [93], und Cholin-Defizienz wird auch heutzutage noch zur Induktion der NASH im Tiermodell angewandt [94]. Da Cholin ein essentieller Bestandteil des Membranlipids Phosphatidylcholin ist, das in der Leber vor allem zum Export von Triglyzeriden in VLDL-Partikeln benötigt wird, führt eine Cholin-Defizienz durch den fehlenden Abtransport zur Entstehung der Hepatosteatose durch Triglyzerid-Akkumulation.

Es wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der Ernährung auf lange Zeit die Besiedelung des Darms durch bestimmte Bakteriengattungen beeinflusst, und sich generell verschiedene sogenannte Enterotypen aufgrund des Darmmikrobioms ausmachen lassen [95]. Speziell bei Fettleibigkeit und der meist damit assoziierten fettreichen und hyperkalorischen Ernährung im Sinne der „*Western diet*“ kommt es zu einem Anstieg von Bakteriengattungen im Darm, die Cholin aus der Nahrung zu Methylamin konvertieren [96, 97], welches von den Bakterien als Kohlenstoffquelle genutzt wird [98]. Gerade bei der in NAFLD-Patienten oft beobachteten Fehlbeseidlung des Dünndarms durch übermäßiges Mikrobewachstum [87] führt dies zu einer generellen Cholin-Defizienz und folglich auch zur Triglyzerid-Akkumulation in den Hepatozyten aufgrund des fehlenden Abtransports durch VLDL-Partikel [99]. Zudem werden Methylamine in der Leber zu Trimethylaminoxiden umgewandelt, die mit Herz-Kreislauf-erkrankungen assoziiert sind und auch schädigend in der Leber wirken können [99, 100].

Ein weiterer Weg, wie sich die Darmflora auf die Pathogenese der NASH auswirken kann, ist eine Erhöhung von *Escherichia*-Bakterien im Mikrobiom von NASH-Patienten im Vergleich zu gesunden oder adipösen Menschen. Übermäßiges Wachstum von Vertretern der Ethanol-produzierenden Bakteriengattung *Escherichia* führt zum Anstieg des endogenen Alkoholgehalts und auch des Blutalkohols, was im Sinne der alkoholischen Fettlebererkrankung auch zur Pathogenese der NASH beitragen kann [101, 102].

1.2.2.6 Immunzellen in der Pathogenese der NAFLD

In der Leber gibt es verschiedene Zelltypen, die zur Entstehung und der Progression der Entzündung in der Hepatosteatitis beitragen. Kupfferzellen, die Makrophagen der Leber, und natürliche

Killerzellen (NK-Zellen), die zytotoxisch wirken können und auch Zytokine produzieren, sind die residenten Immunzellen der Leber. Andere Immunzellen wie Leukozyten, neutrophile Zellen und Blutmonozyten werden bei Schädigung der Leber rekrutiert.

Ein wichtiger Faktor der Entzündungsentstehung in der NAFLD ist die Aktivierung der Leber-residenten Makrophagen, der Kupfferzellen. Dies kann durch exogene und endogene Stimuli, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), ausgelöst werden [103]. PAMPs sind Moleküle, die mit Pathogenen assoziiert sind, wie z.B. LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien oder virale Nukleinsäurevarianten wie doppelsträngige RNA. DAMPs sind endogene Moleküle, die von beschädigten Zellen freigesetzt werden, wie zum Beispiel intrazelluläre Proteine und DNA-Fragmente [104, 105]. Bei der Schädigung von Gewebe können auch Fragmente der extrazellulären Matrix (EZM) als DAMPs agieren [106]. Sowohl PAMPs als auch DAMPs werden von *pattern recognition*-Rezeptoren (PRR) wie den *Toll-like* Rezeptoren (TLR) oder den *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like* Rezeptoren (NLR) erkannt, die generell von Immunzellen exprimiert werden [107]. In der Leber werden solche Rezeptoren auch von den meisten Zelltypen wie Hepatozyten, Kupfferzellen, den sinusoidalen Endothelzellen und den hepatischen Sternzellen exprimiert [108, 109]. Die Aktivierung der PRRs in den Leberzellen führt zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden, was zur lokalen Immunantwort auf die schädlichen Stimuli führt. Dabei werden unter anderem auch inflammatorische NF- κ B-Signalwege aktiviert, die Synthese und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 β induziert, die Phagozytosefähigkeit gesteigert und bei zu großer Schädigung der betroffenen Zellen die Apoptose dieser eingeleitet. Durch die Zytokin-Freisetzung der hepatischen Zellen kommt es zur Infiltration der Leber mit Immunzellen wie Monozyten, und die Persistenz der immunologischen Signale, die eigentlich durch die Initiierung einer Wundheilungsantwort zur Reparatur der Gewebeschäden führen soll, kann die Entzündung größerer Gewebeteile zur Folge haben [108].

Kupfferzellen können sich wie andere Makrophagen auch an den jeweiligen immunologischen Kontext anpassen, wobei ihre metabolischen Funktionen und die Synthese und Sekretion verschiedener Signalmoleküle Kontext-abhängig modifiziert und reguliert werden. Diese Plastizität von Makrophagen führt zu einer Bandbreite an Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen und Fähigkeiten, welche sehr vereinfacht im M1/M2-Paradigma zusammengefasst werden. Im Grunde besagt dieses Paradigma, dass sich Makrophagen durch die Änderung ihrer metabolischen Funktion in Abhängigkeit des immunologischen Kontextes entweder zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen mit inhibierenden und gewebschädigenden Eigenschaften oder zu Proliferations-

fördernden M2-Makrophagen, die die Gewebereparatur unterstützen, differenzieren können [110, 111].

Es wurde gezeigt, dass bei Fettleibigkeit die Zahl der M1-Makrophagen im Fettgewebe ansteigt und mit dem Grad der Fettgewebsentzündung und der Insulin-Resistenz korreliert. Zudem ist auch die Zahl der M1-Makrophagen in der NASH-Leber im Mausmodell erhöht [112]. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der M2-Makrophagen bei schlanken Menschen und Mäusen im Vergleich zu den übergewichtigen Probanden bzw. Tieren höher [113, 114].

Die Polarisierung der Makrophagen geschieht dabei intrazellulär hauptsächlich durch die Aktivierung von JAK-STAT-Signalwegen, bei denen Transkriptionsfaktoren der STAT- (*signal transducer and activator of transcription*) und IRF- (*interferon regulatory factors*) Familie durch Janus-Kinasen (JAK), die mit Membranrezeptoren assoziiert sind, aktiviert werden [115]. Die Aktivierung des Signallings durch externe Stimuli wie Interferone oder *toll-like receptor* (TLR)-Aktivierung führt zur Genexpression typischer M1-Zytokine wie TNF oder MCP-1, während die M2-Polarisierung durch die anti-inflammatorischen Interleukine IL-4 und IL-10 ausgelöst wird [115].

1.2.3 Fibrose und Zirrhose in der NAFLD

Bei Progression der NASH kann es zur Fibrose der Leber kommen, welche durch die exzessive Akkumulation extrazellulärer Matrixkomponenten charakterisiert ist, die als Wundheilungsantwort aufgrund einer chronischen Schädigung der Leber erfolgt [27]. Die Hauptakteure der Fibrogenese in der Leber sind die hepatischen Sternzellen, die in der gesunden Leber im perisinusoidalen Raum in inaktivem Zustand hauptsächlich als Vitamin A-Speicher fungieren [15]. Durch den Kontakt mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF oder IL-1, die bei der Pathogenese der Hepatosteatitis in der Leber von vielen Zellen sekretiert werden, kommt es zur Aktivierung der Sternzellen.

Bei der Aktivierung transdifferenzieren die Sternzellen zu Myofibroblasten, die durch Proliferation, die Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) wie Kollagenen und die Fähigkeit zur Kontraktilität gekennzeichnet sind. Zusätzlich dazu erhöht sich die Migrationsrate, es kommt zur Induktion der Synthese und Sekretion inflammatorischer Zytokine und es verringert sich die Menge des gespeicherten Vitamin A [116].

Aktivierte Sternzellen migrieren an den Ort der Gewebeschädigung und sekretieren große Mengen von EZM-Komponenten mit der Intention, das geschädigte Gewebe zu reparieren. Durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine durch die aktivierten Sternzellen kommt es zur weiteren Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen, die selbst auch inflammatorische Zytokine sekretieren, welche wiederum zur Aktivierung von Sternzellen führen und somit zur Progression der

Fibrose beitragen [117]. Bei fortgeschrittener Fibrose ist die Fläche der extrazellulären Matrix in der Leber 6-mal größer als in der gesunden Leber [27].

Die Aktivierung der Sternzellen führt in der NASH zur exzessiven Deposition von EZM-Komponenten im perisinusoidalen Raum, wobei das Narbengewebe auch teilweise zwischen den einzelnen Hepatozyten eingelagert ist [118]. Die Fibrogenese führt zur grundlegenden Veränderung und Störung der Architektur des Leberparenchyms und der hepatischen Vaskulatur. Ist dies der Fall wird die Fibrose auch als hepatische Zirrhose bezeichnet [119].

Durch die Beeinträchtigung der Fenestrierung der Sinusoide wird der normale Fluss des Blutplasmas im perisinusoidalen Raum und somit der bidirektionelle Stoffaustausch zwischen Hepatozyten und den Sinusoiden verringert oder gar inhibiert, was zum Funktionsverlust der bereits geschädigten Hepatozyten beiträgt [12]. Zusätzlich dazu führt das Narbengewebe zur Verhärtung des Gewebes und zur Distorsion der Sinusoide. Der daraus resultierende vaskuläre Widerstand wird durch die Kontraktilität der aktivierten Sternzellen, die die Sinusoide mit ihren langen Fortsätzen zum Teil auch umfassen, verstärkt [118].

Im Leberparenchym bilden sich zudem regenerative Knötchen, die aus lokal proliferierenden Hepatozyten, die von der übermäßig vorhandenen extrazellulären Matrix umschlossen sind, bestehen [119, 120]. Dabei führt die Bildung der regenerativen Knötchen teilweise auch zur gänzlichen Unterbrechung des Blutflusses zwischen Sinusoid und Zentralvene der einzelnen Leberläppchen.

Dies führt in der fortgeschrittenen Leberzirrhose aufgrund des fehlenden Druckausgleiches durch die verringerte Dehnungsfähigkeit und Beeinträchtigung der Lebervaskulatur zur portalen Hypertension, bei der der Blutdruck in der Pfortader erhöht ist und sich das Blut teilweise staut [121]. Folgen davon sind unter anderem die Bildung abdomineller Varizen [122] und die Ansammlung von größeren Mengen Wasser im Bauch („Aszites“) aufgrund von Wasseraustritt aus den belasteten Gefäßen [123]. Zudem ist durch die Einschränkung des Blutflusses in der Leber auch die Entgiftungs- und Metabolisierungsfunktion sehr beeinträchtigt bis hin zum Funktionsverlust der Hepatozyten [27].

Bei der hepatischen Zirrhose wird zwischen der kompensierten und dekompenzierten Leberzirrhose unterschieden. Werden vitale Funktionen der Leber im zirrhotischen Zustand noch ausreichend ausgeführt, und sind auch keine klinischen Symptome bemerkbar, spricht man von einer kompensierten Zirrhose. Kommt es zur Entstehung von Komplikationen wie zum Beispiel der Entwicklung von ösophagialen Varizen oder Aszites, wird es als dekompenzierte Zirrhose bezeichnet, bei dem durch das Ausmaß der Leberschädigung vitale Funktionen nicht mehr effektiv ausgeführt werden können [124-126].

1.2.4 Diagnose und Therapie der NAFLD

1.2.4.1 Diagnose der NAFLD

Die NAFLD ist bei den meisten Patienten bis zum Grad der fortgeschrittenen Fibrose asymptomatisch und bleibt bei vielen Menschen deswegen Jahre lang undiagnostiziert [127].

Heutzutage ist die nicht-invasive Untersuchung mittels Ultraschall der Leber zur Diagnosestellung bei Fettleber üblich, jedoch ist die Genauigkeit der Ultraschallmethode bei nur kleinen Mengen Fett in der Leber gering und die Diagnosestellung auch von der subjektiven Einschätzung des behandelnden Arztes abhängig [128, 129]. Auch ist es möglich, den Fettgehalt der Leber mittels Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) zu untersuchen, doch ergeben sich daraus im Vergleich zur Ultraschalluntersuchung kaum weitere aufschlussreiche Erkenntnisse [130].

Den Goldstandard zur Diagnose der NASH stellt die invasive Leberbiopsie dar, die sich aber auch durch Fehler bei der Probenentnahme, Schwierigkeiten bei der pathologischen Beurteilung der Probe und der invasiven Natur der Entnahmemethode schwierig gestalten kann [128].

Bei der transienten Elastographie wird die Steifheit der Leber nicht-invasiv über die Geschwindigkeitsmessung der Ausbreitung einer niederfrequenten Ultraschallwelle im Lebergewebe bestimmt [131]. Die Geschwindigkeit ist abhängig von der Steifheit des Gewebes, welche stark mit dem Grad der Fibrose korreliert [132]. Der Einsatz der transienten Elastographie zur Untersuchung der Fibrose bei NAFLD wird durch Adipositas, Aszites und Körperbau begrenzt, da Fett, Wasser oder Knochen die Verbreitung der Ultraschallwellen abbremsen oder beschleunigen und so keine korrekte Messung durchgeführt werden kann [131].

1.2.4.2 Therapie der NAFLD

1.2.4.2.1 Veränderung des Lebensstils und Gewichtsreduktion

Für die Behandlung der NAFLD gibt es noch keine definitive pharmakologische Therapieoption [129, 133]. Aufgrund der Assoziation der NAFLD mit Fettleibigkeit, ungesunder Ernährung und sesshaftem Lebensstil ist eine Lebensstilveränderung mit Umstellung der Ernährung und regelmäßigem Sport, die zur Gewichtsabnahme führt, bisher die vielversprechendste Behandlungsmöglichkeit [134, 135].

Studien mit NASH-Patienten zeigten bereits eine signifikante Verbesserung des Steatose- und Entzündungsgrads bei einem Gewichtsverlust von mindestens 7% des Körpergewichts [136, 137].

Auch hypokalorische Ernährung und Muskeltraining ohne Verringerung des BMI oder Reduktion der Körperfettmasse führen zur Verbesserung verschiedener NAFLD-Parameter wie dem hepatischen Fettgehalt oder der Glukosehomöostase [138, 139].

Auch bariatrische Operationen als ultimative Maßnahme zur Gewichtsreduktion führen zur Verbesserung der hepatischen Steatose, Entzündung und Fibrose bei einem Großteil der NAFLD-Patienten [140].

1.2.4.2.2 Antidiabetika als Therapie in der NAFLD

Die Insulin-Resistenz in peripheren Geweben und der Leber wird als eine der Hauptursachen für die Pathogenese der NASH angesehen und Typ-2-Diabetes ist eine der geläufigsten Komorbiditäten in der NAFLD [141, 142]. Die Gabe anti-diabetischer Medikamente führt je nach Art des Medikamentes zur Inhibition der Glukoneogenese und fördert den Fettsäureabbau, womit die Insulin-Sensitivität von Zellen der Leber und peripherer Gewebe teilweise wiederhergestellt werden kann [143].

Studien zur Auswirkung von Antidiabetika wie Metformin, Pioglitazon und Inkretin-Mimetika auf die NAFLD ergaben zum Teil vielversprechende Ergebnisse wie die Reduktion des Lebersteatosegrades [144-146] oder der Hepatozytenentzündung [147, 148]. Außer dem Antioxidans Vitamin E werden jedoch zurzeit keine weiteren Medikamente für die Therapie der NASH empfohlen, da es keine ausreichende Evidenz für deren Nutzen gibt [149-152].

1.2.4.2.3 Lipidsenker als Therapie in der NAFLD

Die Dyslipidämie, das Vorkommen abnormaler Mengen von Cholesterin und / oder Triglyzeriden im Blut, ist neben anderen Faktoren des metabolischen Syndroms auch mit der NAFLD assoziiert [153, 154]. Die meisten NAFLD-Patienten weisen zusätzlich zur Hepatosteatoe ein atherogenes Lipidprofil, das heißt erhöhte Triglyzerid- und LDL (*low-density lipoprotein*)-Cholesterinwerte und erniedrigte HDL (*high-density lipoprotein*)-Cholesterinwerte, auf [155], welches das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht [156], so dass der Einsatz lipidsenkender Medikamente sinnvoll erscheint. In Studien zur Auswirkung von lipidsenkenden Medikamenten wie Statinen und Fibraten auf die NAFLD mangelt es generell an der Untersuchung der Auswirkung auf die histologischen Manifestationen der NASH, die Ergebnisse sind zum Teil inkonsistent, und die positive Wirkung beschränkte sich meist auf eine Erniedrigung der im Blut gemessenen Leberenzymwerte [129, 157, 158].

Aufgrund dessen wird es empfohlen, Dyslipidämien in NAFLD-Patienten mit Statinen zu behandeln, diese jedoch nicht zur spezifischen Behandlung der NASH zu verwenden [152, 158].

1.2.4.2.4 Antioxidantien als Therapie in der NAFLD

Gemäß des derzeitigen Verständnisses der Pathogenese der NASH spielt oxidativer Stress eine große Rolle [159, 160]. Im Angesicht dessen scheint der Einsatz von Antioxidantien zur NASH-Therapie durchaus sinnvoll.

In den meisten Studien zur Wirkung von Antioxidantien in der NASH-Therapie wurde die Auswirkung von Vitamin E auf die Erkrankung untersucht, und größtenteils wurde eine Abnahme der Leber-Transaminasenwerte im Serum und eine Verbesserung des Steatose- und Entzündungsgrades der Leber beobachtet, jedoch hatte Vitamin E nicht immer Auswirkungen auf die Fibrose [161, 162]. Studien mit größeren Studienpopulationen und längerer Behandlungsdauer werden benötigt, um die Effekte von Antioxidantien bei der Behandlung der NASH zu bestätigen.

1.2.4.2.5 Entzündungshemmende Medikamente als Therapie in der NAFLD

Pentoxifyllin (PTX) ist ein anti-inflammatorisches Xanthin-Derivat, das die Effekte inflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-1 supprimiert und *in vitro* anti-fibrogenische Eigenschaften aufwies [163]. Die Metaanalyse von fünf Studien zur Auswirkung von PTX auf die NAFLD zeigte, dass PTX zur signifikanten Reduktion der Leberenzymwerte im Serum und auch zu einer signifikanten Verbesserung des Steatose-, Entzündungs- und Fibrosegrades der Leberhistologie führte [164]. Obwohl PTX im Rahmen dieser Studien sehr positive Auswirkungen auf die NAFLD hatte, sind noch weitere, umfassendere Studien zur Bestätigung der PTX-Effekte notwendig.

1.2.4.2.6 Probiotika als Therapie in der NAFLD

Da die bakterielle Fehlbesiedelung des Dünndarms als ein Faktor in der Pathogenese der NASH angesehen wird, wurden der Effekt von Probiotika, also nicht-pathogene Mikroorganismen, die sich positiv auf das Immunsystem und den generellen Gesundheitszustand auswirken [165, 166], auf die NAFLD untersucht. Die positiven Effekte werden unter anderem durch die Reduktion der Darmpermeabilität, der Regulation der Zusammensetzung der Darmflora und Auswirkung auf die Zytokinproduktion von Immunzellen bewirkt [167, 168]. Eine Metaanalyse von 4 Studien zur Wirksamkeit von Probiotika in der NAFLD zeigte, dass eine Therapie mit Probiotika zur signifikanten Reduktion der Serumlevel der Leberenzyme, des totalen Cholesterins und des inflammatorischen Mediators TNF führte, und auch die Insulin-Sensitivität in NAFLD-Patienten verbesserte [169].

1.2.4.2.7 Agonisten nukleärer Rezeptoren als Therapie in der NAFLD

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR) ist ein nukleärer Rezeptor für Gallensäuren, der in der Leber, im Darm und im Fett exprimiert wird [170, 171], und als Regulator der Gallensäure-, Lipid- und Glukosehomöostase agiert [172]. FXR besitzt anti-inflammatorische und anti-fibrotische Eigenschaften, die unter anderem aus der Inhibition bestimmter NF- κ B-Signalwege und der Reduktion der hepatischen Expression pro-fibrotischer Gene wie *transforming growth factor β* (TGF β) und Kollagen1a1 (Col1a1) resultieren [173, 174]. Studien, bei denen der FXR-Agonist *Obeticholic acid* zur NASH-Therapie eingesetzt wurde, berichten durchweg von sehr signifikanten Verbesserungen der

Insulin-Resistenz, der Leberenzymwerte und auch des Steatose-, Entzündungs- und Fibrosegrades in der Leberhistologie [175, 176]. Im September 2015 verkündete Intercept Pharmaceuticals (New York, NY, USA) den Beginn einer internationalen Phase-III-Studie zur Untersuchung der Auswirkungen von Obeticholic acid auf NASH-Patienten mit fortgeschrittener Fibrose (REGENERATE), deren Ergebnisse 2021 zu erwarten sind [177, 178].

1.3 CMKLR1 und seine Liganden

Der Rezeptor CMKLR1 und sein endogener Ligand Chemerin werden in der Leber unter anderem von Hepatozyten und Sternzellen exprimiert. Chemerin fungiert als Attraktant für CMKLR1-exprimierende Immunzellen und spielt auch eine Rolle in der Regulation der Insulinsensitivität. In der murinen NASH-Leber ist Chemerin erhöht, während CMKLR1 herunterreguliert ist. Aufgrund der Schlüsselstellung der Entzündung und der Insulin-Resistenz in der Pathogenese der NASH ist eine Rolle dieser Proteine in der Pathogenese der Erkrankung naheliegend. Auch für zwei andere CMKLR1-Liganden, Resolvin E1 und ein verkürztes Chemerin-Peptid, wurden Effekte auf Entzündungsvorgänge im Tierversuch beschrieben.

1.3.1 CMKLR1 (Chemokine-like receptor 1)

CMKLR1 (*Chemokine-like receptor 1*; ChemR23) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) mit sieben transmembranen Domänen, der 1996 aufgrund seiner Sequenzhomologie zu bekannten Chemokin-GPCRs kloniert wurde [179].

CMKLR1 wird in vielen Geweben, unter anderem der Milz, in der fötalen und adulten Leber, Knochenmark, Thymus [179], Endothelien [180], Fettgewebe [181, 182] und Blutgefäßen [183], exprimiert. In diesen Geweben wird CMKLR1 vor allem von Leukozyten wie Makrophagen, dendritischen Zellen [184] und auch natürlichen Killerzellen [185] exprimiert.

In der Leber wird CMKLR1 von Hepatozyten, Gallengangszellen, hepatischen Sternzellen, sinusoidalen Endothelzellen und Kupfferzellen exprimiert [186], jedoch ist die Expression in der adulten Leber im Vergleich zur Expression von CMKLR1 in der Milz oder in Lymphknoten recht gering [187, 188].

CMKLR1 ist intrazellulär an G-Proteine der $G_{i/o}$ -Familie gekoppelt, und die Signaltransduktion über die α -Untereinheit führt unter anderem zur Inhibition der cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) - Produktion durch Adenylcyclasen, zur Freisetzung intrazellulären Calciums und der Aktivierung von PI3K- (Phosphoinositid-3-Kinase) und MAPK (*mitogen activated protein kinase*)- Signalwegen [189].

1.3.2 CMLKR1-Ligand Chemerin

Chemerin (Aliase: TIG2, *tazarotene-induced gene 2*; RARRES2, *retinoic acid receptor responder 2*) wurde 1997 von Nagpal et al. als Genprodukt, das in Antwort auf Stimulation von Haut-Raft-Kulturen mit dem Retinoid Tazaroten hochreguliert wird, entdeckt [190].

Wittamer et al. identifizierten Chemerin 2003 als natürlichen Liganden des GPCRs CMKLR1 [184].

In der Zwischenzeit wurden noch zwei weitere Rezeptoren für Chemerin identifiziert, *G protein-coupled receptor 1* (GPR1) und *C-C chemokine receptor-like 2* (CCRL2), jedoch ist die funktionelle Relevanz beider Rezeptoren bisher relativ unklar.

GPR1 hat eine 40%ige Sequenzhomologie zu CMKLR1, und die Bindung von Chemerin führt zur Internalisation des Rezeptors [191], zu einer geringen intrazellulären Calcium-Freisetzung und zur Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2 [192]. Experimente mit GPR1-Knockout-Mäusen deuten auf eine Rolle von GPR1 in der Regulation der Glukose-Homöostase in der Adipositas hin, da diese Tiere bei Fütterung einer Hochfett-Diät eine schwerwiegendere Glukose-Intoleranz entwickelten als Wildtypen [193].

CCRL2 hat nur geringe Sequenzhomologie zu GPR1 und CMKLR1, und ist strukturell näher mit typischen Chemokin-Rezeptoren verwandt [194]. Die Bindung von Chemerin an CCRL2 führt nicht zur Internalisation des Rezeptors oder zur intrazellulären Signalweitergabe [192]. Da CCRL2 Chemerin nicht wie GPR1 und CMKLR1 am C- sondern am N-Terminus bindet, scheint die bisherige Funktion von CCRL2 die lokale Aufkonzentration und das Präsentieren des C-Terminus von Chemerin für Rezeptoren auf benachbarten Zellen zu sein [195].

1.3.2.1 Expression und Prozessierung von Chemerin

Beim Menschen wird das Chemering zu einem 163 Aminosäuren (AS) großen Pre-Proprotein translatiert, das nach Abspaltung eines 20 AS langen hydrophoben Signalpeptids am N-Terminus als 143 bp langes Protein sezerniert wird [184, 196]. In Anlehnung an die Position der endständigen, C-terminalen AS wird das Proprotein „Chemerin163“ genannt.

1.3.2.1.1 Expression von Chemerin

Chemerin wird vor allem in der Plazenta, in weißem Fettgewebe und in der Leber exprimiert, und in geringeren Mengen auch in vielen anderen Geweben wie Pankreas, Lunge, Ovarien und den Nieren [197, 198]. Im Fettgewebe wird Chemerin vor allem von Adipozyten exprimiert [181, 182], und stellt wahrscheinlich die größte Quelle des systemischen Chemerins im Blut dar [199].

In der Leber wird Chemerin unter anderem von Hepatozyten und hepatischen Sternzellen exprimiert, wobei letztere aber nur einen Bruchteil der von Hepatozyten sekretierten Chemerin-Menge freisetzen [200].

1.3.2.1.2 Prozessierung von Chemerin

Das sezernierte Proprotein Chemerin₁₆₃ ist in nanomolaren Konzentrationen ubiquitär im Blutplasma zu finden und hat nur eine geringe biologische Aktivität.

Durch C-terminale Modifizierung des Proproteins, bei der von verschiedenen Proteasen, die in die Koagulation, die Fibrinolyse und in Entzündungen involviert sind, mehrere Aminosäuren abgespalten werden, entstehen Chemerin-Peptide mit unterschiedlicher biologischer Aktivität. Von diesen Isoformen haben Chemerin₁₅₆ [196] und Chemerin₁₅₇ [184] die höchste Bioaktivität, wobei Chemerin₁₅₇ biologisch noch aktiver zu sein scheint als Chemerin₁₅₆ [201]. Das Prochemerin Chemerin₁₆₃, Chemerin₁₅₈, Chemerin₁₅₅ oder Chemerin₁₅₄ haben kaum beziehungsweise keine biologische Aktivität in Bezug auf die Aktivierung von CMKLR1, agieren aber teilweise als Zwischenstufen zur Generierung der aktiven Isoformen [202]. Aktive Peptide können durch Chymase aus Mastzellen, die Neutrophilen-assoziierte Proteinase 3 [203] oder das *Angiotensin-converting enzyme* (ACE) [204] weiter zu inaktiven Isoformen prozessiert werden.

Anzumerken ist, dass das murine Pre-Prochemerin (Chemerin₁₆₂) eine Aminosäure kürzer ist als das humane Pre-Prochemerin, und die murine Isoform Chemerin₁₅₆ die höchste biologische Aktivität besitzt (s. Abb. 3) [205].

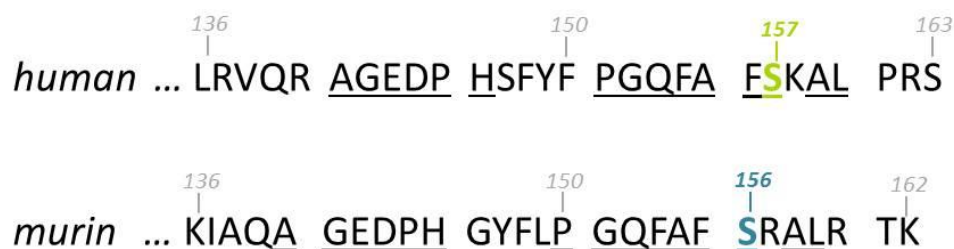


Abbildung 3 Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenz von humanem und murinem Pre-Prochemerin. Humanes Pre-Prochemerin besteht aus 163 AS, während murines Pre-Prochemerin nur 162 AS besitzt. Da bei der Prozessierung zu Isoformen mit hoher biologischer Aktivität Peptide mit dem AS-Motiv „PGQFAFS“ am C-Terminus gebildet werden, ist **Chemerin₁₅₆** das murine Homolog zum humanen **Chemerin₁₅₇**.

Dargestellt sind die annotierten Proteinsequenzen von humanem (NCBI Referenz-Sequenz *NP_002880.1*) und murinem (NCBI Referenz-Sequenz *NP_001334097.1*) Pre-Prochemerin ab AS 136 bis zum C-Terminus.

1.3.3 Weitere CMKLR1-Liganden: Chemerin-C15-Peptid und Resolvin E1

1.3.3.1 Chemerin-C15-Peptid

Aufgrund der Abhängigkeit der Chemerin-Bioaktivität von der Prozessierung des C-Terminus designten Cash et al. unterschiedlich lange C-terminale Chemerin-Peptide und untersuchten deren Effekte im Vergleich zu rekombinantem murinen Chemerin₁₅₆ (rmChemerin) auf Makrophagen [206]. Dabei zeigte sich, dass vor allem ein 15 Aminosäuren langes Peptid (A¹⁴⁰-A¹⁵⁴) die pro-inflammatorische Zytokinproduktion von Makrophagen mit der gleichen Effizienz und Wirksamkeit wie das rekombinante Chemerin inhibiert, jedoch nur geringe Auswirkung auf die Makrophagen-Migration hat. Die vollständige Wirkungslosigkeit von rekombinantem Chemerin und dem C15-Peptid auf die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren und die Migration in CMKLR1-defizienten Makrophagen zeigt, dass diese anti-inflammatorischen Effekte durch CMKLR1 vermittelt werden und, dass C15 ein funktioneller CMKLR1-Ligand ist [206]. In einem Peritonitis-Modell wurden anti-inflammatorische Effekte von C15 beobachtet, welches auch die Wundheilung durch Abschwächung der Entzündungsantwort *in vivo* fördert [207].

1.3.3.2 Resolvin E1

Resolvine sind Mediatoren, die von ω -3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren abstammen, lokal am Ort der Entzündung gebildet werden und durch Reduktion der Neutrophilen-Infiltration und Zytokin-Produktion zur Auflösung der Entzündung führen [208]. RvE1 wird aus der ω -3-Fettsäure Eicosapentaensäure gebildet und wurde 2005 von Arita et al. als weiterer CMKLR1-Ligand identifiziert [209].

Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von RvE1 wurden bereits in mehreren Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen untersucht und auch bestätigt. Bei induzierter Lungenerkrankung in Mäusen verbesserte RvE1 die Entzündungsauflösung durch Förderung der Apoptose und Phagozytose von Neutrophilen [210]. In einem Tiermodell der Zymosan-induzierten Peritonitis führte eine RvE1-Behandlung zur signifikanten Reduktion der Infiltration von Granulozyten und trug so zur Auflösung der Entzündung bei [211].

In einem Colitis-Modell wurde gezeigt, dass die anti-inflammatorischen und protektiven Eigenschaften von RvE1 durch CMKLR1-vermittelte Abschwächung des intrazellulären NF- κ B-Signallings wirken [212].

1.3.4 Funktionen von CMKLR1 und seinen Liganden

Die bisherigen Untersuchungen und Experimente zeigen eine Beteiligung von CMKLR1 und seinen Liganden, dabei vor allem von Chemerin, bei physiologischen und pathologischen Prozessen in vielen

Gewebe, wie zum Beispiel der Haut [213], dem Fettgewebe [181], der Leber [200] und den Ovarien [214].

Es wurde gezeigt, dass Chemerin durch Chemotaxis die Migration von CMKLR1-exprimierenden dendritischen Zellen und Makrophagen induzieren kann [184], das Chemerin/CMKLR1-Signalling die Phagozytose und Adhäsion von Makrophagen fördert [215, 216] und auch die Produktion von Zytokinen beeinflussen kann [206], was zur Annahme einer Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden in Entzündungsvorgängen führte. Zudem spielt das CMKLR1/Chemerin-System auch eine Rolle bei der Differenzierung von Adipozyten und der Aufrechterhaltung des adipozitären Metabolismus [181]. Weiterhin fördert Chemerin auch die Angiogenese durch Induktion der Endothelzellmigration und Kapillarbildung [217], und es wurde gezeigt, dass CMKLR1-vermittelte Vasokonstriktion zur Regulation des Blutdruckes beitragen kann [218]. Zusätzlich scheinen CMKLR1 und seine Liganden auch bei pathologischen Vorgängen des Gehirns wie der Alzheimer-Krankheit [219] und als neuroendokriner Regulator im Hypothalamus [220] eine Rolle zu spielen, und auch in Pathologien der weiblichen Fortpflanzungsorgane involviert zu sein [214, 221].

In die intrazellulären Vorgänge, die auf die Aktivierung von CMKLR1 durch die Ligandenbindung folgen, sind Kinasen wichtiger Signalkaskaden wie p38, PI3K, Akt und ERK1/2 involviert, und es wurde auch gezeigt, dass das Signalling teilweise von NF- κ B abhängig ist [222, 223].

1.3.4.1 Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden in Entzündungen

Chemerin und CMKLR1 wurden bei der Untersuchung entzündlicher Krankheiten im Menschen und einiger Krankheitsmodelle im Tierversuch dabei sowohl im pro- als auch im anti-inflammatorischen Kontext gefunden, so dass CMKLR1-exprimierende Leukozyten als Immun-Effektorzellen mit mehreren Funktionen verstanden werden, die im Zusammenhang mit der schnellen und effizienten Prozessierung von Chemerin zu Isoformen mit unterschiedlicher Aktivität eine angemessene Immunantwort auf die vorgefundene Situation auslösen, wobei diese pro- oder anti-inflammatorisch sein kann [224].

1.3.4.1.1 Pro-inflammatorische Rolle des CMKLR1/Chemerin-Systems

Für eine pro-inflammatorische Rolle des Chemerin/CMKLR1-Systems spricht die Erhöhung des systemischen Chemerinspiegels bei chronischen Entzündungskrankheiten wie Morbus Crohn, ulzerativer Colitis [225], chronischer Pankreatitis [226] und Nierenerkrankung [227, 228] und auch bei Sepsis [229]. Weiterhin kommt es oft zu einer direkten Erhöhung der Chemerin-Expression im betroffenen Gewebe, wie zum Beispiel bei der Autoimmunkrankheit *Lupus erythematoses*, wo neben der Expression von Chemerin in Endothelzellen dermalen Blutgefäße auch die Expression von CMKLR1 auf dendritischen Zellen in dem betroffenen Gewebe nachgewiesen wurde [230].

Interessanterweise sind diese Erhöhungen der Chemerin-Expression im betroffenen Gewebe anscheinend lokal begrenzt, da sich der Unterschied in der Expression meist nicht auf den systemischen Chemerinlevel auswirkt. Zum Beispiel ist auch der Anteil prozessierter Chemerin-Isoformen am Gesamt-Chemerin in arthritischer Synovialflüssigkeit im Vergleich zur Verteilung der Isoformen im systemischen Blutplasma erhöht [231].

Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung der Rolle von Chemerin und CMKLR1 in einem Tiermodell der multiplen Sklerose, dass der Knockout von CMKLR1 im ganzen Tier zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf und einer Reduktion der Makrophagen-Infiltration ins zentrale Nervensystem führt [232]. In einem durch Zigarettenrauch induzierten Modell der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) in Mäusen führte der CMKLR1-Knockout zu einer weniger schweren Entzündungsantwort, die mit einer Verringerung der Infiltration von Neutrophilen und dendritischen Zellen in die Gewebe einherging [233].

1.3.4.1.2 Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden

Im Gegensatz dazu führte in einem Modell der viralen Pneumonie der Knockout von CMKLR1 zu erhöhter Mortalität der Mäuse, zur Beeinträchtigung der Lungenfunktion und der erhöhten Infiltration neutrophiler Zellen [234].

Durch die Behandlung mit Chemerin kam es in einem durch LPS induzierten Modell akuter Lungenentzündung zur geringeren Neutrophilen-Infiltration ins Lungengewebe und der Reduktion der Zytokinproduktion. Bei CMKLR1-Knockout-Mäusen zeigte sich in diesem Krankheitsmodell trotz der Chemerin-Gabe eine erhöhte Infiltration neutrophiler Zellen und eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF oder IL-6 im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, die mit LPS behandelt wurden. Dies zeigt neben der starken anti-inflammatorischen Rolle von Chemerin in diesem Kontext auch, dass diese Funktion von Chemerin strikt von CMKLR1 abhängig ist [235].

1.3.4.1.2.1 Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und Chemerin-Peptiden

Wie bereits erwähnt, zeigten Cash et al. (2008), dass nur die Prä-Inkubation mit einem 15 AS langen, C-terminalen Chemerin-Peptid ähnlich starke anti-inflammatorische Effekte auf LPS- oder Interferon- γ (IFN- γ)-stimulierte Makrophagen hatte wie die Prä-Inkubation mit rmChemerin. Dabei kam es zur Inhibition der Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren und im Gegenzug zur Hochregulation der IL-10- und TGF β -Expression. Keines der anderen untersuchten Chemerin-Peptide zeigte ähnliche anti-inflammatorische Eigenschaften. Die Prä-Inkubation von CMKLR1-defizienten Makrophagen mit rmChemerin oder C15 führte zu einer starken Beeinträchtigung des anti-inflammatorischen Effekts. In einem durch Zymosan induzierten Modell der murinen Peritonitis führte die intraperitoneale Injektion von C15 zur Reduktion der Neutrophilen- und Makrophagen-Rekrutierung und der

Abschwächung des Entzündungsverlaufs durch Reduktion der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Wildtyp (WT), während die Behandlung mit C15 in CMKLR1-defizienten Mäusen die Rekrutierung der Immunzellen nicht unterdrücken konnte [206]. Bei der weiteren Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften des C15-Peptids wurde beobachtet, dass das Peptid die Phagozytose mikrobieller Partikel und apoptotischer Zellen durch Makrophagen fördert [215].

1.3.4.1.2.2 Anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 und Resolvin E1

Weitere Hinweise auf eine anti-inflammatorische Rolle von CMKLR1 geben Versuche mit RvE1. In einem Zymosan-induzierten Peritonitis-Modell führte die Vorbehandlung mit RvE1 zur signifikanten Reduktion der Neutrophilen-Infiltration [209]. Zudem beschützte RvE1 Mäuse auch vor der Entwicklung einer durch Trinitrobenzolsulfonsäure induzierten Colitis durch die Blockierung der Leukozyten-Infiltration in das Kolon [236]. RvE1 hat einen zweiten Rezeptor, den GPCR Leukotrien B4 Rezeptor 1 (BLT1), und greift so in das pro-inflammatorische Signalling des Leukotriens B4 ein [211, 237]. Demzufolge interagiert RvE1 mit zwei distinkten GPCRs, um Entzündungen aufzulösen.

1.3.4.2 Rolle von Chemerin als Adipokin und der systemische Chemerinspiegel in der Adipositas

Die Rolle von Chemerin als Adipokin wurde seit der Entdeckung der Chemerin- und CMKLR1-Expression in Adipozyten des weißen Fettgewebes [181] in humanen und tierischen Studien näher untersucht.

Anscheinend sind CMKLR1 und Chemerin in die Entwicklung und Homöostase des Fettgewebes involviert, da in der Fibroblastenzelllinie 3T3-L1 gezeigt wurde, dass die Chemerin-Expression im Laufe der Differenzierung der Zellen zu Adipozyten stark zunimmt, während die Expression von CMKLR1 herunterreguliert wird [182]. Die Reduktion oder Inhibition von CMKLR1 oder Chemerin in 3T3-Präadipozyten oder Knochenmarkstammzellen, die auch zu Adipozyten differenzieren können, führte zur starken Beeinträchtigung der Differenzierung zu reifen Adipozyten [181, 238].

Leptin (ob/ob)- und Leptin-Rezeptor (db/db)-defiziente Mäuse [239] und Tiere, bei denen durch Hochfett-Diät Adipositas induziert wurde [240, 241], haben erhöhte systemische Chemerinlevel, und in humanen Studien wurde eine positive Assoziation des Serum-Chemerins mit dem BMI festgestellt [182]. Zudem korreliert die systemische Chemerin-Konzentration mit dem Taille-zu-Hüft-Quotienten (*waist-to-hip-ratio*, WHR), dem Taillenumfang [242] und der Masse des viszeralen Fettgewebes [242-244].

Vor allem in Patienten mit metabolischem Syndrom zeigt sich oft eine positive Korrelation des Serum-Chemerins mit dem Anstieg verschiedener Marker des metabolischen Syndroms wie Triglyzeridgehalt im Blut, LDL-Cholesterin, Insulin-Resistenz und Blutdruck [242, 244-247].

Einhergehend damit korreliert die Reduktion des systemischen Chemerinspiegels bei Gewichtsreduktion – ob durch bariatrische Operation oder durch Ernährungsumstellung und/oder Sport bewirkt – positiv mit dem Taillenumfang, der Insulin-Resistenz, der Masse des viszeralen Fettgewebes und der Nüchternblutglukose [248-251].

Dies führt auch zu der Annahme, dass das meiste des zirkulierenden Chemerins im Blutplasma aus dem Fettgewebe stammt, obwohl Chemerin auch von anderen Zellen, vor allem auch in der Leber in größeren Mengen [199], exprimiert wird. Dafür spricht auch die generell signifikant höhere Expression von Chemerin-mRNA in subkutanem und omentalem Fettgewebe bei Adipositas im Vergleich zu Normalgewicht, wobei nur die Expression im omentalen Fettgewebe mit dem systemischen Chemerinspiegel positiv korreliert [250].

1.3.4.3 Rolle von CMKLR1 und Chemerin in der Glukose- und Insulin-Regulation

Chemerin und CMKLR1 scheinen auch in die Glukose- und Insulin-Regulation involviert zu sein, und eventuell eine Rolle in der Pathogenese von Typ-2-Diabetes (T2D) zu spielen, da auch in normalgewichtigen T2D-Patienten der systemische Chemerinspiegel im Vergleich zu normoglykämischen Probanden erhöht ist [199].

Chemerin- bzw. CMKLR1-defiziente Mäuse haben einen normalen Nüchtern-Blutglukosewert, weisen bei Fütterung jedoch eine Glukose-Intoleranz auf, die mit einer Beeinträchtigung der Insulin-Sekretion und der Glukose-Aufnahme in Muskelzellen und Zellen des weißen Fettgewebes assoziiert sind [252, 253]. In transgenen Mäusen führt die chronische Überexpression von Chemerin zu einer Verbesserung der Glukose-Toleranz und der Glukose-abhängigen Insulin-Sekretion [253]. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung adipöser db/db-Mäuse mit rmChemerin zu einer Verschlechterung der Glukose-Intoleranz [239].

Auch *in vitro*-Untersuchungen zur Rolle von Chemerin und CMKLR1 in der Glukosehomöostase ergaben inkonsistente Ergebnisse, da gezeigt wurde, dass die Stimulation von 3T3-L1-Adipozyten mit Chemerin sowohl zur Erhöhung [254] als auch zur Reduktion [255] der Insulin-stimulierten Glukose-Aufnahme in die Adipozyten führen kann.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) stellt in der heutigen Zeit die Hauptursache chronischer Lebererkrankungen dar und steht im Zusammenhang mit

der weltweit steigenden Zunahme der Verbreitung der Adipositas und damit einhergehender Komorbiditäten. Das Krankheitsspektrum der NAFLD umfasst Pathologien der Leber von der durch Lipidakkumulation entstandenen Fettleber über die Hepatosteatitis (nicht-alkoholische Steatohepatitis, NASH) bis hin zur Fibrose der entzündeten Leber.

Das Chemokin Chemerin wird unter anderem von Adipozyten und Hepatozyten exprimiert und spielt mit seinem Rezeptor CMKLR1 eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen und als Regulator der Glukose- und Lipidhomöostase.

Der systemische Chemerinspiegel korreliert moderat positiv mit dem Body-Mass-Index (BMI) und ist laut einiger Studien in der NASH erhöht. Die hepatische CMKLR1- und Chemerin-Expression ist in der NASH verändert, wobei hier sowohl eine erniedrigte als auch eine erhöhte Expression beschrieben wurde.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von CMKLR1 und seinen Liganden in der NAFLD in Tiermodellen der Diät-induzierten NASH und durch Untersuchung humaner Serum- und Leber-Proben näher zu erforschen.

In Serum- und Lebergewebe-Proben von NAFLD-Patienten sollte der systemische Chemerinspiegel und die hepatische Expression von Chemerin in der NAFLD untersucht werden, und der Zusammenhang mit weiteren NAFLD-Parametern analysiert werden. Zudem sollte *in vitro* die Auswirkung von Agonisten nukleärer Rezeptoren wie FXR (*farnesoid X receptor*) auf die Chemerin-Expression und –Sekretion in einer Hepatozyten- und Sternzell-Zelllinie gezeigt werden.

In einem Diät-induzierten Tiermodell der NASH sollte die Auswirkung einer Intervention mit den CMKLR1-Liganden Resolvin E1 und dem Chemerin-C15-Peptid, die laut Literatur in Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen anti-inflammatorische Eigenschaften gezeigt hatten, auf die Entzündung und Fibrose *in vivo* untersucht werden.

Weiterhin sollten auch die Effekte der hepatischen Überexpression zweier Chemerin-Isoformen auf die Entwicklung und Progression einer Diät-induzierten NASH im Tiermodell analysiert werden, und durch Chemerin-Überexpression in einer Hepatozyten-Zelllinie die Auswirkungen *in vitro* rekapituliert werden.

Diese Untersuchungen sollen helfen, Einsichten in die Funktionen und Effekte von CMKLR1 und seinen Liganden in der NAFLD zu bekommen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav VX-150	Systec
Brutschrank Heraeus BBD6220	Thermo Fisher Scientific
Brutschrank ORBITAL INCUBATOR S150	Stuart
Countess II Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra
Feinwaage PLE 200-3	Kern & Sohn GmbH
Foam Pads	Bio-Rad
gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec
Imaging System ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad
Kamera-Controller DS-U1	Nikon
Kamm für SDS-PAGE, 10-well und 15-well, 1,0 mm	Bio-Rad
Konfokalmikroskop D-Eclipse C1	Nikon
Kühlplatte CP60	Microm
Kühlzentrifuge Centrifuge 5424 R	Eppendorf
Laminar Flow Bench Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific
LightCycler® 1.5 Instrument	Roche
Magnetrührer MR3000D	Heidolph
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Membran-Vakuumpumpe N86 KN.18	KNF
Mikrotom HM400	Mikrotom
Mikrowelle HF12M240	Siemens
Mini Trans Blot Module	Bio-Rad
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad
Mini-Zentrifuge Sprout™	Biozym
Multistepper Handystep S	Brand
Multistepper Multipette® plus	Eppendorf
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific
Paraffin-Streckbad 1052	GFL
PCR-Cycler T1 Thermocycler	Biometra
pH-Meter pH level 1	InoLab
Pipettensatz Research®/Research® plus	Eppendorf
Pipettierhilfe Accu-jet	BRAND
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf
Pipettierhilfe neoPipette Controller	Neolab
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph
Power supply PowerPac 200	Bio-Rad
Power supply PowerPac Basic	Bio-Rad
Präparatmappe mit Deckel	Hartenstein
Reinstwasseranlage Milli-Q® Biocel	Millipore

Short Plates	Bio-Rad
Sicherheitsabzug	LABCONTROL TROX Technik
Sicherheitsspritzflasche	Hartenstein
Spacer Plates, 1,0 mm	Bio-Rad
Spülmaschine Professional G 7883 CD	Miele
Thermoblock TB1	Biometra
Thermomixer comfort/compact	Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 2070	Bandelin
Vortex REAX 1	Heidolph
Vortex V1	IKA
Waage 440-45N	Kern & Sohn
Waage SC6010	Scout
Wasserbad WNE 14	Memmert
Wide Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96well-Platten	Corning
Aspirationspipetten, 5 ml	BD
Aufbewahrungsdosen	Hartenstein
Discardit™ II Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD
Microlance™ 3 Kanülen (18G, 20G, 21G, 27G)	BD
Biopsy Punch 6 mm	Stiefel
Biosphere-Filterspitzen (20 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Combitips advanced (2,5 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf
Countess™ Cell Counting chamber slides	Thermo Fisher Scientific
Cryobox	VWR
Cryoröhrchen, 2 ml	Corning
Deckgläschen Menzel-Gläser 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific
Einweg-Skalpell (#11, #15, #22)	FEATHER
Entsorgungsbeutel	VWR
epT.I.P.S.® 50 - 1000 µl	Eppendorf
Filterspitzen SafeSeal® low binding, steril (100 µl, 200 µl)	Biozym
Immuno-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad
Injekt®-F solo, 1 ml	B. Braun
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark
Kleenex Facial Tissues	Kleenex
Mikro-Probengefäß 1,3 ml K3 EDTA	Sarstedt
M-Tubes gentleMACS™	Miltenyi Biotec
Objektträger Menzel-Gläser SUPERFROST ULTRA PLUS®	Thermo Fisher Scientific
PARAFILM® M	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten Glas	Brand

Pasteurpipetten Polyethylen	Brand
PCR-Tubes, 0,5 ml, bunt	Biozym
Petrischalen (100 x 15 mm)	BD
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1250 µl)	Sarstedt
Polypropylen-Röhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Polypropylen-Sedimentierröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Rotilabo-Cryobox für Cryoröhrchen	Roth
Rundbodenröhrchen, 14 ml	BD
Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Schraubröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Seakem® LE Agarose	Biozym
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt
SHIELDskin CHEM® NEO NITRIL® 300 Handschuhe	SHIELD Scientific
Steriflip-GP 0,22 µm, 50 ml	Merck Millipore
Sterilisationsklebeband	Hartenstein
Swingsette™ Biopsie-Einbettkassetten	Roth
Zellkultur-Flaschen mit Belüftung (75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt
TouchNTuff 300 mm Nitrilhandschuhe	Ansell
Vakuumfiltrationssystem „rapid“-Filtermax (150 ml, 500 ml)	TPP
Wägeschälchen, 80 x 80 mm	Heathrow Scientific
Whatman gel blotting paper GB003	Sigma Aldrich
Zellkulturpetrischalen (100 x 20 mm)	BD
Zellkulturplatten (6 well, 12 well, 24 well)	BD
Zellschaber 13,5 mm, 16 cm	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, 15 ml konisch PP	Biochrom

2.1.3 Kit-Systeme

Alanin-Aminotransferase (ALT)-ELISA Kit	USCNK Cloud Clone
CHOD-PAP (Cholesterinmessung)	Diaglobal
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
DuoSet® ELISA Human Chemerin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Mouse Adiponectin	R&D Systems
DuoSet® ELISA Mouse Chemerin	R&D Systems
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Genopure Plasmid Midi Kit	Roche
Hepcidin 25 (bioactive) HS	DRG Diagnostics
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen
Mouse Insulin ELISA	Mercodia
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP Kit	Thermo Fisher Scientific

QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen
Quantichrom™ Glucose Assay Kit	Biotrend
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Substrate Reagent Pack	R&D Systems
Triglycerid-GPO-PAP	Roche

2.1.4 Chemikalien

2%ige Bisacrylamid-Lösung	Bio-Rad
2-Propanol p.A.	Merck Millipore
40%ige Acrylamid-Lösung	Bio-Rad
Aceton p.A.	Merck Millipore
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ampicillin	Ratiopharm
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA (fatty acid free)	Roche
BSA (Fraktion V) für ELISA	Sigma-Aldrich
Chloroform p.A.	Merck Millipore
cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad
Desoxycholat	Sigma-Aldrich
Difco™ LB Agar, Miller	BD
Difco™ LB Broth, Miller	BD
DMEM F-12	Lonza
DMEM mit stabilem Glutamin, 4,5 g/l Glukose	Biochrom
DMSO	Sigma-Aldrich
Dulbecco's PBS, 1x	Sigma-Aldrich
Entellan®	Merck Millipore
Eosin G-Lösung	Roth
Essigsäure (99%)	Merck Millipore
Ethanol abs. p.A.	Merck Millipore
Ethanol technisch	Chemikalienausgabe Universität Rgb
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck Millipore
Fibronectin from bovine plasma	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung 37 %	Merck Millipore
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom & Sigma-Aldrich
Glycerin p.A.	Merck Millipore
Glycin p.A.	Merck Millipore
GW4064, ≥ 97% (FXR-Agonist)	Sigma-Aldrich
Hämalaun-Lösung	Roth
HEPES ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich
Immersionsöl Type NF	Nikon
Kaliumchlorid	Merck Millipore
L-Glutamin, 200 mM	Thermo Fisher Scientific

Lipofectamine™ 3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific
Lipopolysaccharid von <i>E.coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver Reform	Frema
Magnesiumchlorid	Merck Millipore
Methanol p.A.	Merck Millipore
Methanol technisch	Chemikalienausgabe Universität Rgb
Murines Chemerin-C15-Peptid	Metabion
NaCl, 0,9%	B. Braun
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid p.A.	Merck Millipore
Natriumdihydrogenphosphat	Merck Millipore
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Millipore
Natriumhydroxid	Merck Millipore
Natriumpyruvat, 100 mM for cell culture	Biochrom
NCS (newborn calf serum)	Biochrom
Nukleasefreies Wasser	Promega
Opti-MEM™ mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific
PBS Dulbecco-Pulver für 1 Liter	Merck Millipore
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech
PeqGOLD Prestained Protein Marker V	Peqlab
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Quick-Load 1 kb DNA-Ladder	NewEnglandBioLabs
Quick-Load 100 bp DNA-Ladder	NewEnglandBioLabs
Recombinant human TNF protein, carrier free	R&D Systems
Resolvin E1	Biomol
Rosiglitazon ≥ 98%	Biomol
Roti®-GelStain	Roth
Roti-Histol	Roth
Salzsäure rauchend	Merck Millipore
Schwefelsäure rauchend	Merck Millipore
SOC Outgrowth Medium	NewEnglandBioLabs
T0901317, ≥ 98% (LXR-Agonist)	Sigma-Aldrich
TEMED	Merck Millipore
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (= Tris-Base)	Merck Millipore
Tris-HCl	Merck Millipore
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Scientific
Trypsin 0.05%/EDTA 0.02%	PAN-Biotech
Trypsin 0.25%/EDTA 0.02%	PAN-Biotech
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 30%	Merck Millipore
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit DNA

50x TAE

Tris-NH ₃	121 g
Essigsäure	28,6 ml
0,5 M EDTA, pH 8.0	50 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

10x Gelladepuffer

87% Glycerin	5,8 ml
Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
0,5 M EDTA, pH 8.0	ad 10 ml
=> Lagerung bei 4°C	

2.1.5.2 Puffer und Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

2.1.5.2.1 Puffer und Lösungen für die Extraktion von Proteinen

RIPA-Lysepuffer für Proteinisolation aus Zellen

3 M NaCl	2,5 ml
10% Igepal	0,5 ml
Desoxycholat	0,25 g
20% SDS-Lösung	0,25 ml
1 M Tris, pH 7.5	2,5 ml
ddH ₂ O	ad 50 ml
=> Lagerung bei 4°C	

-vor Gebrauch wurden cOmpleteTM Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOPTM Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugegeben-

RIPA-Lysepuffer für Proteinisolation aus Gewebestücken mit GentleMACS-Tubes

3 M NaCl	2,5 ml
Desoxycholat	0,25 g
1 M Tris, pH 7.5	2,5 ml
ddH ₂ O	ad 50 ml
=> Lagerung bei 4°C	

-vor Gebrauch wurden cOmpleteTM Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosSTOPTM Phosphatase Inhibitor Cocktail frisch zugegeben-

Um übermäßige Schaumbildung zu vermeiden, wurden 10% Igepal (100 µl pro ml RIPA) und 20% SDS-Lösung (5 µl pro ml RIPA) erst nach Dissoziation und Homogenisierung der Gewebeprobe mit dem GentleMACS zugegeben.

2.1.5.2.2 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Lösung für 15% Laufgele, pH 8.7

40% Acrylamid	30 ml
2% Bisacrylamid	3,4 ml
3 M Tris-HCl, pH 8.7	10 ml
20% SDS-Lösung	0,4 ml
ddH ₂ O	32 ml

=> Lagerung bei 4°C

Zur Herstellung von 15%igen Laufgelen wurden pro ml Laufgel-Mix 5 µl APS (Polymerisationsinitiator) und 3 µl TEMED (Polymerisationskatalysator) zugegeben. Die Laufgele wurden gleich nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet.

Lösung für 5% Sammelgele, pH 6.8

40% Acrylamid	5 ml
2% Bisacrylamid	2,6 ml
1 M Tris-HCl, pH 6.8	5 ml
20% SDS-Lösung	0,2 ml
ddH ₂ O	24 ml

=> Lagerung bei 4°C

Zur Herstellung von 5%igen Sammelgelen wurden pro ml Sammelgel-Mix 10 µl APS (Polymerisationsinitiator) und 3 µl TEMED (Polymerisationskatalysator) zugegeben. In das noch flüssige Sammelgel wurden gleich nach dem Gießen Taschenkämme gesteckt.

5x Lämmli

1 M Tris-HCl, pH 6.8	0,3 ml
20% Glycerin	5 ml
20% SDS-Lösung	2 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml
Bromphenolblau	0,025 g
ddH ₂ O	ad 10 ml

10x SDS-PAGE-Laufpuffer

Glycin	144 g
Tris-NH ₃	30 g
20% SDS-Lösung	50 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Entfärber für Coomassie

Eisessig	50 ml
EtOH 100%	200 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

2.1.5.2.3 Puffer und Lösungen für Western Blotting**10x Tank-Puffer**

Glycin	140 g
Tris-NH ₃	30 g
20% SDS-Lösung	25 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Wettransfer-Puffer

MeOH	200 ml
10x Tank-Puffer	80 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

10x TBS

Tris-NH ₃	24,2 g
NaCl	80 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Einstellung des pH-Wertes 7.6 mit HCl

1x TBS-T

1x TBS	1 l
Tween® 20	1 ml

5% Blockierlösung

1x TBS-T	100 ml
Magermilchpulver	5 g
<i>=> Lagerung bei 4°C</i>	

Antikörperlösung (Lösung zur Verdünnung und Aufbewahrung primärer Antikörper)

BSA	7,5 g
Natriumazid	0,5 g
Tween® 20	0,5 g
1x TBS	ad 0,5 l
<i>=> nach Sterilfiltration Lagerung bei 4°C</i>	

2.1.5.2.4 Puffer und Lösungen für ELISAs

ELISA-Waschpuffer

Tween® 20	0,5 ml
1x PBS	ad 1 l

Reagent Diluent für ELISA

BSA	5 g
1x PBS	ad 0,5 l
=> nach Sterilfiltration Lagerung bei 4°C	

2.1.6 Medien zur Kultivierung von Prokaryoten und Eukaryoten

2.1.6.1 Medien zur Kultivierung und Selektion von Prokaryoten (*E. coli*)

Zur Herstellung des Plasmids pHTN-Chemerin162 wurden transformierte *E. coli* auf LB-Agarplatten und in LB-Flüssigmedium mit Ampicillin-Selektion kultiviert.

Ampicillin-Stocklösung 100 mg/ml

Ampicillin-ratiopharm®	1 g
ddH ₂ O	10 ml

LB-Agarplatten mit Ampicillin-Selektion

Difco™ LB Agar, Miller (Luria-Bertani)	25 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Nach dem Autoklaviervorgang (15 min bei 120°C) wurde der noch flüssige Agar unter Rühren auf ca. 50-60°C abgekühlt, Ampicillin 100 mg/ml zugegeben (1000x; Arbeitskonzentration 100 µg/ml) und in Petrischalen gegossen.

LB-Flüssigmedium mit Ampicillin-Selektion

Difco™ LB Broth, Miller	25 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Nach dem Autoklaviervorgang (15 min bei 120°C) wurde das Medium unter Rühren auf ca. 50-60°C abgekühlt und Ampicillin 100 mg/ml zugegeben (1000x; Arbeitskonzentration 100 µg/ml).

2.1.6.2 Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Für die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurde generell DMEM-Medium ohne Pyruvat, mit stabilem Glutamin, 3.7 g/l NaHCO₃ und 4.5 g/l D-Glukose verwendet, das mit 1% Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Für die Kultivierung von HepG2- und Hepa1-6-Zellen bzw. LX-2-Zellen wurden noch

10% bzw. 2% FBS zum Medium gegeben. Für die 24-stündige serumfreie Inkubation von Zellen vor einer Stimulation wurde DMEM-Medium ohne FBS verwendet.

2.1.7 Enzyme

<i>EcoRI</i> -HF	New England Biolabs
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcriptase System	Promega
<i>SacII</i>	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primäre Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Firma</u>	<u>Wirtsspezies</u>
Chemerin (α -human)	R&D	Ziege
Chemerin (α -murin)	R&D	Ziege
GAPDH	Cell Signaling	Kaninchen

2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

<u>sekundärer Antikörper</u>	<u>Firma</u>	<u>Wirtsspezies</u>
Anti-Kaninchen-Antikörper, HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	Esel
Anti-Ziege-Antikörper, HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research	Esel

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Oligonukleotide für die mRNA-Expressionsanalyse mit dem LightCycler®

Für die Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene wurde das LightCycler® 1.5-System mit dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit verwendet. Die Oligonukleotidpaare zur Amplifizierung von Abschnitten der cDNA wurden so designt, dass die Spezifität des amplifizierten cDNA-Stückes gegeben ist und zudem eventuell vorhandene genomische DNA nicht amplifiziert werden kann. Dafür wurde zum Teil das *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche (https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von metabion (Planegg, Deutschland) bezogen.

2.1.9.1.1 Oligonukleotide für die Expressionsanalyse muriner Gene

<u>Name</u>	<u>Sequenz Primer uni 5' → 3'</u>	<u>Sequenz Primer rev 5' → 3'</u>	<u>Länge Amplikon</u>
18SrRNA	GATTGATAGCTCTTTCTCGATTCC	CATCTAAGGGCATCACAGACC	217 bp
α-SMA	CCAGCACCATGAAGATCAAG	CTTCGTCGTATTCTGTTTGC	129 bp

CCL3*	TGCCCTTGCTGTTCTTCTCT	GTGGAATCTTCCGGCTGTAG	113 bp
CCL5*	TGCAGAGGACTCTGAGACAGC	GAGTGGTGTCCGAGCCATA	149 bp
CCL7*	TTCTGTGCCTGCTGCTCATA	TTGACATAGCAGCATGTGGAT	91 bp
CD163	GTTGTGACCGCCTGTATGAG	TTCCCAACTAGCTTTTCACCTC	308 bp
CD38*	ACGCTGCCTCATCTACACTC	GGGGCGTAGTCTTCTCTTGT	132 bp
CD68	TGATCTTGCTAGGACCGCTTA	CCCCTTGGACCTTGGACTA	357 bp
Chemerin	AAACACCCACCTGTGCAGT	TTTTACCCTTGGGGTCCATT	213 bp
CMKLR1	CTTCTCCCCTAATCCCCTCA	GGGGTGAGTGAGCCATTTT	233 bp
Col1a1	CAGGGTCCTCCTGGTTCTC	GACCGTGAGTCCGTCTTTG	124 bp
CTGF	CAAAGCAGCTGCAAATACCA	GGCCAAATGTGTCTTCCAGT	188 bp
F4/80	TGCTCTTCTGATGGTGAGA	CCCCGTCTCTGTATTCAACC	182 bp
IL6*	CTCTGGGAAATCGTGAAAT	CCAGTTTGGTAGCATCCATC	134 bp
Ly49C*	CCCTATTCCAGGGAGCTGT	TCTGTTTACCAGGAAGGAAGATG	129 bp
MCP-1	AACTCTCACTGAAGCCAGCTCT	CTCTTGAGCTTGGTGACAAAAA	253 bp
Ncr1*	TTGGCTCTTACAACGACTATGC	GTTGAAAGGTCAAACCTCCAAT	138 bp
TGFβ	CTGGGCACCATCCATGAC	CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA	140 bp
TNFα*	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	GGGCTGGGTAGAGAATGGAT	352 bp

* diese Primerpaare wurden im Rahmen dieser Arbeit designt und getestet

2.1.9.1.2 Oligonukleotide für die Expressionsanalyse humaner Gene

<u>Name</u>	<u>Sequenz Primer uni 5' → 3'</u>	<u>Sequenz Primer rev 5' → 3'</u>	<u>Länge Amplikon</u>
Chemerin	GGTCCACTGCCCCATAGAG	TTATCATGGCTGGGGATAGAA	256 bp
CMKLR1	ACCTGCATGGGAAAATATCCT	GAGGTTGAGTGTGTGGTAGGG	299 bp

2.1.9.2 Oligonukleotide für die Klonierung von murinem Chemerin162 in pHTN-HaloTag®-CMV-neo

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>	<u>Länge Amplikon</u>	<u>Restriktionsschnittstelle</u>
uni	CGAGAATTCAAGTGCTTGCTGATCTCCCTA	546 bp	<u>EcoRI</u>
rev	CGACCGCGGTTATTGGTTCTCAGGGCCCT		<u>SacII</u>

2.1.9.3 Oligonukleotide für die Sequenzierung des Inserts in pHTN-HaloTag®-CMV-neo

<u>Name</u>	<u>Sequenz 5' → 3'</u>	<u>Bindestelle in pHTN-Plasmid</u>
pHTNSeqpr.uni 1	CTG AGG ATC TGT ACT TTC AGA GCG AT	47-22 bp vor Insert-ORF
pHTNSeqpr.uni 2	GCT GTC GAC GCT CGA GAT TT	82-63 bp vor Insert-ORF
pHTNSeqpr.rev 1	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GT	14-33 bp nach Insert-ORF
pHTNSeqpr.rev 2	GCA GGA ATT GGG CCC AAA TC	70-89 bp nach Insert-ORF

2.1.10 Organismen

<u>Viren</u>	<u>Herkunft</u>
Adeno-assoziierte Viren, Serotyp 8, mit Expressionsplasmid pAAV-AFP-MMAP-RARRES2 (<i>Chemerin162-Überexpressions-Plasmid</i>)	SIRION Biotech
Adeno-assoziierte Viren, Serotyp 8, mit Expressionsplasmid pAAV-AFP-MMAP-Chemerin156 (<i>Chemerin156-Überexpressions-Plasmid</i>)	SIRION Biotech
Adeno-assoziierte Viren, Serotyp 8, mit Expressionsplasmid pAAV-empty (<i>Kontrollplasmid</i>)	SIRION Biotech

<u>Prokaryoten</u>	<u>Herkunft</u>
NEB® 5-alpha Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency)	DH5α (New England Biolabs)

<u>Eukaryoten - Zelllinien</u>	<u>Herkunft</u>
HepG2	humanes hepatozelluläres Karzinom (ATCC)
LX-2	immortalisierte primäre humane hepatische Sternzellen (Merck Millipore)
Hepa1-6	murines Hepatom (ATCC)

<u>Eukaryoten - Säugetiere</u>	<u>Herkunft</u>
C57BL/6	Inzuchtstamm der Spezies <i>Mus musculus domesticus</i> (Charles River)

2.2 Methoden

2.2.1 Humane Proben

2.2.1.1 Humane Leberproben zur Analyse der Chemerin-mRNA-Expression in der NAFLD

Zur Analyse der Chemerin-Expression auf mRNA-Ebene in der NAFLD wurden Lebergewebsproben von Patienten mit mittels Biopsie gestellter NAFLD-Diagnose und entsprechenden Kontrollen aus den Jahren 2004 bis 2012 herangezogen. Die Weiterverarbeitung der Gewebeproben und experimentelle Prozeduren mit den humanen Proben wurden entsprechend der Richtlinien der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR (*Human Tissue and Cell Research*, Regensburg) mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten und Bewilligung der örtlichen Ethikkommission der Universität Regensburg durchgeführt [256].

Das Gewebe stammt von Patienten, die sich aus verschiedenen Gründen einer Operation an der Leber unterziehen mussten: hepatische Metastasen extrahepatischer Tumore (65 Patienten), fokale noduläre Hyperplasie der Leber (8 Patienten), Adenome (5 Patienten), Cholangiokarzinom (14 Patienten), hepatozelluläres Karzinom (11 Patienten) und andere Krankheiten (6 Patienten). Durch die Anamnese wurde Alkoholabusus, Medikamente und virale Infektionen als Grund für die Lebererkrankung ausgeschlossen, und es wurde nur gesundes Gewebe zur weiteren Analyse verwendet. Bei der histologischen Untersuchung und Bewertung des Grades und der Schwere der Steatose, Entzündung und Fibrose der Leberproben wurde der NASH-Score der einzelnen Patienten errechnet, wobei ein Score ≥ 5 als NASH-Manifestation gewertet wurde [26].

Die Spenderdaten sind in Tabelle 1 dargestellt. Diese Proben wurden unlängst auch in anderen Studien verwendet [257, 258].

Tabelle 1 Mediane und Wertespanne der Spenderdaten inklusive Komorbiditäten und NASH-Score von Lebergewebsproben zur Untersuchung der Chemerin-mRNA-Expression in der NAFLD. BMI, Body-Mass-Index; ALT, Alanin-Aminotransferase; AST, Aspartat-Aminotransferase; AP, Alkalische Phosphatase; T2D, Typ-2-Diabetes; AH, arterieller Hypertonus; HC, Hypercholesterinämie; [Anzahl der Patienten, für diese der jeweilige Wert vorlag].

• signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten mit einem NASH-Score < 5 ;

† signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und Patienten mit einem NASH-Score ≥ 5 ;

‡ signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit einem NASH-Score < 5 und Patienten mit einem NASH-Score ≥ 5 .

	Kontrollen (Σ 33)	Fettleber (Σ 39)	NASH (Σ 37)	p-Wert
<i>Männer/Frauen</i>	16/17	15/24	24/13	
<i>Alter [Jahre]</i>	58 (20 – 82)	60 (24 – 84)	66 (33 – 82)	0,015 †
<i>BMI [kg/m^2]</i>	24,7 (18,3 – 30,5)	29,0 (22,0 – 43,2)	28,3 (21,0 – 57,7)	$< 0,001$ •†
<i>ALT [U/l]</i>	21 (8 – 50) [32]	32 (17 – 411) [30]	34 (10 – 984) [34]	$< 0,001$ •†
<i>AST [U/l]</i>	23 (8 – 42) [27]	29 (11 – 434) [29]	30 (9 – 389) [33]	0,020 •; 0,009 †
<i>AP [U/l]</i>	102 (46 – 203) [29]	101 (37 – 444) [30]	90 (45 – 826) [34]	
<i>Bilirubin [mg/dl]</i>	0,6 (0,19 – 1,95) [30]	0,51 (0,19 – 1,99) [31]	0,53 (0,20 – 0,53) [35]	
<i>T2D</i>	0	3	11	0,01 †

AH	7	17	17	
HC	0	2	10	
Steatose	0 (0 – 0)	2 (1 – 2)	2,5 (1 – 3)	< 0,001 •†‡
Entzündung	0 (0 – 0)	0 (0 – 2)	2 (0 – 3)	0,003 •; < 0,001 †‡
Fibrose	0 (0 – 0)	0 (0 – 2)	2 (0 – 4)	0,03 •, < 0,001 †‡
NASH-Score	0 (0 – 0)	2 (1 – 4,5)	6 (5 – 9)	< 0,001 •†‡

2.2.1.2 Humane Blutproben zur Analyse des systemischen Chemerinspiegels im Serum in der NAFLD

Zur Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD wurden Serumproben einer zweiten Kohorte bestehend aus Patienten mit Ultraschall-gesicherter NAFLD-Diagnose und entsprechenden Kontrollen verwendet. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt, und alle Teilnehmer wurden vorher über alle Risiken aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung.

Die Ultraschall-Untersuchung wurde von zertifizierten Medizinern durchgeführt, wobei beide Leberlappen aus sub- und interkostaler Perspektive im Liegen untersucht wurden. Bei erhöhter Echogenität der Leber im Vergleich zum Nierenparenchym wurde die Diagnose Fettleber gestellt. Von diesen Patienten und entsprechenden gesunden Kontrollen ohne Fettleber wurden Blutproben genommen und das Serum gewonnen. Durch die Anamnese wurden Faktoren wie Alkoholabusus, Medikamente oder eine virale Infektion, die eine Fettleber hervorrufen können, ausgeschlossen. Die Spenderdaten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Diese Proben wurden unlängst auch in anderen Studien verwendet [259, 260].

Tabelle 2 Mediane und Wertespanne der Spenderdaten von Blutproben zur Untersuchung des systemischen Serum-Chemerinspiegels in der NAFLD. T2D, Typ-2-Diabetes; BMI, Body-Mass-Index; WHR, Waist-to-hip ratio (Taille-Hüft-Verhältnis); AST, Aspartat-Aminotransferase; ALT, Alanin-Aminotransferase; LDL, low density lipoprotein.

	keine Steatose (Σ 32)	Steatose (Σ 24)	p-Wert
Männer/Frauen	13/19	13/11	
T2D	6	5	
Alter [Jahre]	56,5 (21 – 88)	62,5 (20 – 80)	
BMI [kg/m ²]	25,6 (18,0 – 38,1)	27,5 (19,3 – 39,7)	
WHR	0,94 (0,73 – 1,2)	0,97 (0,8 – 1,2)	
Albumin [g/l]	47,0 (34,8 – 56,0)	46,0 (31,6 – 52,8)	
AST [U/l]	28,0 (16,0 – 48,0)	32,0 (20,0 – 48,0)	
ALT [U/l]	20,0 (12,0 – 44,0)	24,0 (12,0 – 44,0)	
Ferritin [ng/ml]	78 (19 – 1402)	204 (3 – 872)	0,011
LDL [mg/dl]	112 (44 – 340)	21 (4 – 41)	
Transferrin-Sättigung [%]	20 (6 – 33)	21 (4 – 41)	
Triglyceride [mg/dl]	116 (48 – 344)	130 (56 – 392)	
totales Cholesterin [mg/dl]	14 (112 – 528)	212 (120 – 336)	

<i>Bilirubin [mg/dl]</i>	0,5 (0,3 – 1,9)	0,6 (0,2 – 1,7)	
<i>Systolischer Blutdruck [mmHg]</i>	130 (86 – 165)	139 (104 – 180)	
<i>Diastolischer Blutdruck [mmHg]</i>	80 (50 – 98)	80 (63 – 108)	
<i>Adiponectin [μg/ml]</i>	4,1 (1,5 – 22,6)	2,7 (1,1 – 8,7)	0,031

2.2.2 Arbeiten mit Versuchstieren

Alle Tierversuche wurden vom Versuchstierkomitee der Universität Regensburg genehmigt und erfüllten die Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und des „*Guide for the care and use of laboratory animals*“ aus dem Jahre 1999 des Instituts für Labortierforschung (Washington, USA). Die Experimente wurden entsprechend der Tierschutz-Versuchstierordnung der Regierung der Oberpfalz durchgeführt.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mit einem 12-stündigen Hell-/Dunkel-Zyklus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

2.2.2.1 Versuchstiere und Präparation: Wildtyp C57BL/6-Mäuse

In dieser Arbeit wurden männliche C57BL/6-Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Diese Mausrasse ist die in der Forschung am meisten genutzte Rasse und ideal für Diät-induzierte Fettleibigkeit [261].

Männliche C57BL/6-Mäuse wurden nach Akklimatisierung im Alter von 9 Wochen entweder 2 Wochen mit einer MCD-Diät oder für 12 Wochen mit einer atherogenen Paigendiät gefüttert. Vor der Präparation wurden die Mäuse über Nacht nüchtern gesetzt und am nächsten Morgen durch Asphyxie mit CO_2 und anschließendem Genickbruch getötet. Sofort im Anschluss wurde durch kardiale Punktion Herzblut gewonnen und zur Gewinnung des Blutplasmas in EDTA-beschichtete 1,3 ml K3E-Probengefäße gegeben, welche später abzentrifugiert wurden und daraus das Blutplasma abgenommen wurde. Zudem wurden Leber, Milz, verschiedene Fettgewebe (epididymal, perirenal, subkutan, braunes Fettgewebe) und der Oberschenkelmuskel aus der Maus präpariert, für die spätere RNA- und/oder Proteinisolation sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Für histologische Untersuchungen wurde zudem von jedem präparierten Gewebe ein Stück bzw. bei der Leber der Lobus medialis sinister in Biopsieeinbettkassetten in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschließend paraffiniert.

2.2.2.2 Tiermodelle: Diät-induzierte Fettlebererkrankung bei C57BL/6

In dieser Arbeit wurden zwei Tiermodelle zur Diät-induzierten Fettlebererkrankung verwendet, die Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät; E15653-94, Ssniff, Soest) und die Paigen-Diät (S7803-E012, Ssniff, Soest, Deutschland). Zur Kontrolle und Einschätzung der NASH-Induktion durch

die Diäten wurden auch entsprechende Kontrolldiäten (MCD-Kontrolle E15654-04 und Paigendiät-Kontrolle S7803—E000, Ssniff, Soest) verfüttert.

2.2.2.2.1 Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät)

Die Fütterung einer MCD-Diät ist ein weit verbreitetes Tiermodell der NASH, und führt zu Fettlebererkrankung, die durch Steatose, Hepatozytenschädigung, Entzündung und Fibrose gekennzeichnet ist [262]. Das Fehlen von Cholin hemmt die *de novo* Synthese von Phosphatidylcholin, einem wichtigen Bestandteil der VLDL-Partikel. VLDL-Partikel transportieren neben Cholesterin und Phospholipiden Triglyzeride aus der Leber in den Körper. Bei der MCD-Diät führt die Inhibition der Bildung von VLDL-Partikeln zur Anhäufung von Triglyzeriden in der Leber, die in Vesikeln in den Hepatozyten gelagert werden [94]. Das Fehlen von Methionin als essentielle Aminosäure führt zum einen zu Problemen bei der Synthese neuer Proteine, zum anderen ist Methionin Substrat für die Synthese des Methylgruppendonors S-Adenosylmethionin (SAM) und des Antioxidans Glutathion (GSH). Diese zwei Stoffe spielen eine wichtige Rolle als Co-Faktoren bei der Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels und beim Schutz der Zelle vor oxidativem Stress [263]. Studien zeigten, dass niedrige SAM- und GSH-Spiegel, vor allem in den Mitochondrien der Hepatozyten, zur Entstehung der charakteristischen Merkmale der Diät-induzierten NASH wie Hepatozytenschädigung, Entzündung, oxidativem Stress und Fibrose führen [262]. Die MCD-Diät und die entsprechende Kontrolldiät wurden für 2 Wochen gefüttert.

2.2.2.2.2 Atherogene Paigendiät

Das andere in dieser Arbeit verwendete Tiermodell der NASH war die Fütterung der Paigendiät. Die Paigendiät ist eine Hochfettdiät (30%), die zudem 1,25% Cholat und 0,5% Cholesterin enthält. Diese Diät wurde anfänglich hauptsächlich zur Erforschung der Atherogenese in Mäusen verwendet, da sie zur Entstehung von artherosklerotischen Pathologien wie der Ablagerung von Schaumzellen in Arterien und einem atherogenen Lipoprotein-Profil führt [264]. In neueren Studien wurde gezeigt, dass die Fütterung dieser atherogenen Diät auch zur Entstehung einer fortschreitenden Hepatosteatose mit Entzündung und Fibrose führt [265]. Dabei werden die einsetzenden Entzündungsvorgänge durch den hohen Cholesteringehalt des Futters ausgelöst, während das im Futter enthaltene Cholat zur Aktivierung fibrotischer Gene in der Leber führt [266]. Die Paigendiät und die entsprechende Kontrolldiät mit 4% Fett wurden für 12 Wochen gefüttert.

2.2.2.3 AAV8-vermittelte hepatische Überexpression von Chemerin162 und Chemerin156 in C57BL/6-Mäusen

Zur hepatischen Überexpression von Chemerin162 oder Chemerin156 in C57BL/6-Mäusen wurde die durch Adeno-assoziierte Viren (AAV)-vermittelte Integration von Gensequenzen in das Genom von Wirtsorganismen genutzt. Das Adeno-assoziierte Virus ist ein Mitglied der Familie der Parvoviridae, und ist zur Replikation auf Helferviren, wie zum Beispiel Adeno- oder Herpesviren, angewiesen. Auch aufgrund seiner nicht-vorhandenen Pathogenität ist AAV der Virus der Wahl in der humanen Gentherapie [267]. Das AAV-Genom besteht aus einem ca. 4,7 kb langem, einzelsträngigen linearen DNA-Strang mit einem *inverted terminal repeat* (ITR) an jedem Ende. Zwischen den ITRs liegen *open reading frames* (ORF) von Proteinen, die zur Virusreplikation und für das Viruscapsid benötigt werden [268]. Zum Einsatz in der Genforschung werden im AAV-Genom die viruseigenen Gene durch das gewünschte Transgen ersetzt. Zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln werden Wirtszellen wie z.B. Hek293 mit dem rekombinanten AAV-Vektor und zusätzlichen Plasmiden, die die ursprünglichen AAV-Gene und aus Adenoviren-isolierte Helfergene tragen, transfiziert und die fertigen Viruspartikel durch Dichtegradientenzentrifugation aus dem Zelllysats aufgereinigt [269]. Wenn AAVs Zellen infizieren, wird das zwischen den ITRs liegende Transgen ins Wirtsgenom integriert, wo es dann transkribiert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten Viruspartikel mit Chemerin162- oder Chemerin156-Expressionsplasmiden und entsprechende Kontrollviren wurden von SIRION Biotech (Martinsried) hergestellt.

Pro Tier wurden 1×10^{11} Viruspartikel intraperitoneal injiziert.

Die Expressionsspezifität wurde über den chimären Leber-spezifischen α -Fetoprotein-Enhancer/Albumin-Promoter und die Verwendung von Adeno-assoziierten Viren des hepatotropen Serotyps 8 erzielt.

2.2.3 Arbeiten mit Zellen

2.2.3.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.3.1.1 Kultivierung der Zelllinien LX-2, HepG2 und Hepa1-6 in der Zellkultur

Die Zelllinien LX-2, HepG2 und Hepa1-6 wurden in dieser Arbeit für verschiedene Stimulations- und Transfektionsversuche verwendet, und wurden ähnlich kultiviert.

Die humane Sternzelllinie LX-2 wurde durch Transformation primärer humaner hepatischer Sternzellen mit SV40 T Antigen immortalisiert [270]. Hepatische Sternzellen werden bei Leberschädigung aktiviert und tragen durch Sezernierung von Kollagenfasern in die extrazelluläre

Matrix zur Entstehung von Leberfibrose bei [27]. Funktionell haben LX-2-Zellen entscheidende Eigenschaften primärer Sternzellen in Bezug auf Genexpression und Fibrogenese beibehalten [271]. Die humane Hepatozytenzelllinie HepG2 stammt von einem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen Jungen ab [272], und ist eine der am besten charakterisierten Zelllinie für die Untersuchung von Hepatozyten *in vitro*.

Die murine Hepatozytenzelllinie Hepa1-6 stammt aus dem Hepatom einer C57L-Maus, und sekretiert Leber-spezifische Proteine wie z.B. Albumin und α -Fetoprotein [273].

LX-2-, HepG2- und Hepa1-6-Zellen sind adhärente Zellen und wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM-Medium mit FBS-Supplementation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Humidität kultiviert. Für LX-2-Zellen wurden 2% FBS zum Medium gegeben, HepG2- und Hepa1-6-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FBS kultiviert.

Beim Erreichen von 80-90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, 3 ml Trypsin-Lösung zu den Zellen gegeben und die Zellkulturflasche für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich sichtbar vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die Reaktion wurde dann mit FBS-haltigem Anzuchtmedium abgestoppt, noch nicht abgelöste Zellen durch vorsichtiges Klopfen und wiederholtes Spülen des Flaschenbodens abgelöst und die Zellsuspension in Falcons überführt. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 1200 rpm für 5 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Anzuchtmedium resuspendiert und je nach Wachstum der Zellen unterschiedliche Verdünnungen der Suspension in neue Kulturflaschen pipettiert.

2.2.3.1.2 Aussäen von Zellen für Stimulations- und Transfektionsversuche

Um eine definierte Anzahl von Zellen stimulieren oder transfizieren zu können, wurden die Zellen immer am Vortag nach Abtrypsinierung und Auszählung mit dem Countess® II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific) in der geeigneten Aussaatdichte in Petrischalen und wells von multiwell-Platten (s. Tabelle 3) gesät.

Tabelle 3 Aussaatdichte pro well von 6well- und 12well-Platten oder in Petrischalen bei den verschiedenen Zelllinien.

	pro well einer 6well-Platte (9,5 cm ²)	pro well einer 12well-Platte (3,8 cm ²)	pro Petrischale (58,1 cm ²)
<i>HepG2</i>	1 Mio Zellen	400.000 – 500.000 Zellen	6 Mio Zellen
<i>Hepa1-6</i>	600.000 Zellen	300.000 Zellen	3,5 – 4 Mio Zellen
<i>LX-2</i>	1 Mio. Zellen	400.000 Zellen	6 Mio Zellen

2.2.3.1.3 Transfektion von Hepa1-6 mit Lipofectamin3000® zur Chemerin162-Überexpression

Zur Transfektion von Hepa1-6-Zellen mit dem pHTN-Chemerin162-Plasmid wurde Lipofectamin3000® als Transfektionsreagenz verwendet. Dabei wird das Prinzip der Lipofektion angewandt [274], bei dem im Reagenz befindliche Komponenten Liposomen bilden, die die zu transfizierende Nukleinsäure einschließen und diese durch Fusion mit der Plasmamembran ins Innere der Zelle bringen.

Für die Transfektion wurden Hepa1-6-Zellen am Vortag in 6well-Platten ausgesät. Etwa eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen gewechselt und die Zellkultur-Platten wieder in den Brutschrank gestellt. Die Lipofectamin3000®-Transfektionsmischung wurde nach Herstellerangaben pipettiert und zu den Zellen gegeben. Nach zweitägiger Inkubation der Zellen wurden diese geerntet und der Erfolg der Transfektion mittels Analyse der RNA- oder Proteinexpression überprüft.

2.2.3.1.4 Stimulation von Zellen

2.2.3.1.4.1 Stimulation von Hepa1-6-Zellen mit LPS

Die Hepa1-6-Zellen wurden 24 Stunden nach Lipofektion mit dem pHTN-Chemerin162-Plasmid für 24 Stunden mit 10 ng/μl, 100 ng/μl oder 1 μg/μl LPS (in ddH₂O gelöst) stimuliert. Dafür wurde das Medium der transfizierten Zellen abgesaugt, frisches Medium mit entsprechenden LPS-Konzentrationen bzw. bei der Kontrolle ohne LPS zu den Zellen gegeben und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und für weitere Analysen aufbewahrt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und zur Proteinextraktion in RIPA-Puffer vom well-Boden geschabt.

2.2.3.1.4.2 Stimulation von HepG2- und LX-2-Zellen mit T0901317, GW4064 und Rosiglitazon

Zur Stimulation von HepG2- und LX-2-Zellen mit den Agonisten nukleärer Rezeptoren wurden pro well einer 6well-Platte 1 Millionen HepG2- bzw. LX-2-Zellen ausgesät und nachdem sich die Zellen auf den Boden gesetzt haben, für 24 Stunden serumfrei gesetzt. Danach wurde frisches, serumfreies Medium mit den entsprechenden Konzentrationen der Stimulantien (s. Tabelle 4) und entsprechende Negativkontrollen zu den Zellen gegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Überstände von den Zellen abgenommen und für weitere Analysen aufbewahrt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und zur Proteinextraktion in RIPA-Puffer vom well-Boden geschabt.

Tabelle 4 Konzentrationen und Lösungsmittel der eingesetzten Stoffe zur Stimulation von HepG2 und LX-2.

Stimulans	eingesetzte Konzentrationen	Lösungsmittel
<i>T0901317</i>	0 μM, 5 μM, 10 μM	Dimethylsulfoxid (DMSO)
<i>GW4064</i>	0 μM, 1 μM, 2 μM	Dimethylsulfoxid (DMSO)
<i>Rosiglitazon</i>	0 μM, 7.5 μM, 15 μM	Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.3.1.5 Bestimmung der Zytotoxizität mittels Laktat-Dehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Um mögliche zytotoxische Effekte eines Stimulanzmittels oder infolge der Transfektion auf die Zellen zu untersuchen, wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH) von Roche verwendet. Mit diesem Kit wird die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase gemessen, das bei Zellschädigung aus dem Zytosol in den Überstand freigesetzt wird und mit der Menge der lysierten Zellen in der Kultur korreliert [275].

Bei diesem Assay setzt im Überstand vorhandene Laktatdehydrogenase das im Reaktionsgemisch enthaltene Laktat zu Pyruvat um, wobei das Coenzym NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. In der Folgereaktion werden die zwei Heliumprotonen des reduzierten NADH/H^+ auf ein gelbes Tetrazolium-Salz übertragen, was dadurch zu einem roten Formazan-Salz reduziert wird. Durch die Messung der Absorption des Formazan-Salzes bei 490 nm kann die LDH-Aktivität kolorimetrisch bestimmt werden, da die Menge an LDH im Überstand direkt mit der Bildung des Formazan-Salzes korreliert.

Für die LDH-Messung wurde der abgenommene Überstand für 5 Minuten bei 4°C mit 4000 rpm abzentrifugiert, damit im Überstand vorhandene Zellen pelletiert werden, da diese zu falsch-positiven oder zu hohen Werten führen können. Vom zellfreien Überstand wurden 10 µl (bei Serum-haltigem Überstand) oder 50 µl (bei Serum-freiem Überstand) pro well in Dreifachwerten in eine 96well-Platte pipettiert und mit Serum-freiem Medium auf 100 µl pro well aufgefüllt. Dann wurden 100 µl des Reaktionsgemisches in jedes well pipettiert, die Platte mit einer Folie abgeklebt und für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei 490 nm ausgelesen. Als Negativkontrolle und zur Hintergrundkorrektur diente das entsprechende Kulturmedium ohne Serum.

2.2.3.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.2.3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Das im Rahmen dieser Arbeit klonierte Plasmid pHTN HaloTag® CMV-neo-Chemerin162 wurde in *E. coli* propagiert.

E. coli-Bakterien wurden entweder in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit entsprechender antibiotischer Selektion bei 37°C kultiviert. Nach Transformation von *E. coli* mit dem Plasmid wurden mit dem Drigalski-Spatel und sterilen Pipettenspitzen unter sterilen Bedingungen Verdünnungsausstriche auf LB-Agarplatten mit entsprechender Selektion gemacht, um Einzelkolonien zu erhalten.

2.2.3.2.2 Transformation kompetenter DH5α-Zellen mittels Hitzeschock

Zur Propagation des klonierten Plasmids wurde der Ligationsansatz mittels Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Dazu wurden tiefgefrorene kompetente *E. coli*-Zellen für 10 Minuten auf Eis aufgetaut, 5-10 µl des Ligationsansatz zu den Zellen gegeben, das Reaktionsgefäß leicht 4-5 mal geschneipst und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 30 Sekunden bei 42°C inkubiert, danach für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 900 µl RT-warmen SOC-Medium für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Von der angewachsenen Suspension wurden 1:10- und 1:100-Verdünnungen in SOC-Medium gemacht und davon jeweils 100 µl auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotikum-Selektion ausgestrichen. Die Platten wurden dann bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3.2.3 Plasmid-Präparation aus *E.coli* im kleinen Maßstab (Miniprep)

Zur Überprüfung der Plasmide wurden nach der Hitzeschock-Transformation gewachsene Einzelkolonien von *E. coli* in LB-Flüssigmedium mit entsprechender Selektion angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Zur Plasmidisolierung aus der gewachsenen Bakteriensuspension im kleinen Maßstab wurde das QIAprep Spin Mini Kit von Qiagen verwendet. Bei diesem Kit werden die Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgeschlossen, und Proteine, chromosomale DNA und weitere Zellbestandteile präzipitiert. Plasmid-DNA bleibt dabei gelöst im Überstand und wird anschließend über Silicamembran-Säulchen aufgereinigt und eluiert.

Für die Präparation wurden *E. coli*-Einzelkolonien mit sterilen Pipettenspitzen von der Selektionsplatte in 4 ml LB-Medium mit entsprechender Selektion überimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die angewachsenen Kulturen wurden in geeignete Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm für 1 Minute abgefugt, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und das Reaktionsgefäß 4 – 6-mal invertiert. Nach Zugabe des Puffer P2 kam es durch den alkalischen pH des Puffers P2 und dem in Puffer P1 enthaltenen Indikator zu einem Farbumschlag nach blau. Gleich danach wurden 350 µl des Puffer N3 zugegeben und das Reaktionsgefäß 4 – 6-mal invertiert, wobei die Farbe der Suspension wieder farblos wurde, da durch Puffer N3 der pH der Lösung wieder neutralisiert wurde. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand auf ein QIAprep Spin-Säulchen geladen, das Säulchen für eine Minute bei 13000 rpm abgefugt und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl Puffer PB und danach 750 µl Puffer PE gewaschen, und das leere Säulchen für 1 Minute bei 13000 rpm trockengefugt. Zur Elution wurden 50 µl Puffer EB in die Mitte der Membran gegeben und die Plasmid-DNA nach einminütiger Inkubation bei 13000 rpm eluiert.

2.2.3.2.4 Plasmid-Präparation aus *E.coli* in größerem Maßstab (Midiprep)

Zur Plasmidisolierung aus transformierten *E. colis* in größerem Maßstab wurde das Genopure Plasmid Midi Kit von Roche verwendet.

Als Starterkultur wurde eine Einzelkolonie in 10 ml LB-Medium mit entsprechender Selektion steril überimpft und für 5-10 Stunden bei 37°C bei 150 rpm inkubiert. Für die Kultur zur Plasmid-Präparation wurden 1-5 ml der Starterkultur in 100 ml LB-Medium mit entsprechender Selektion überimpft und über Nacht (10-15 Stunden) bei 37°C geschüttelt.

Die angewachsene *E. coli*-Kultur wurde dann mit 4000 x g bei 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen mit 4 ml Suspensions-Puffer (+ RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Lyse-Puffer zugegeben, das Gefäß 6 – 8-mal invertiert und bei Raumtemperatur 2-3 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml gekühltem Neutralisationspuffer, wurde das Gefäß 6 – 8-mal invertiert, und die homogene Suspension wurde dann 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde nach Filtration über einen befeuchteten Filterpapiertrichter zur Klärung der Suspension auf eine equilibrierte NucleoBond-Säule gegeben, und der Durchfluss verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 5 ml Waschpuffer, wurde die sich auf der Säule befindliche Plasmid-DNA mit 5 ml vorgewärmten Elutionspuffer eluiert. Die nun im Durchfluss vorhandene Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 3,6 ml Isopropanol präzipitiert und anschließend für 30 Minuten bei 4°C mit 15000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde die pelletierte Plasmid-DNA mit 3 ml gekühltem 70% Ethanol gewaschen, für 10 Minuten bei 4°C mit 15000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem das Pellet an der Luft getrocknet war, wurde die Plasmid-DNA in 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration am Nanodrop gemessen.

2.2.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.4.1 Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren mit dem NanoDrop

Zur Messung der Konzentration und dem Reinheitsgrad von DNA- und RNA-Isolationen wurde das Nanodrop-Spectrophotometer von Thermo Fisher Scientific verwendet. Gemessen wird dabei die Absorption bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm. Die daraus errechneten Werte der Quotienten A260/A230 und A260/A280 geben einen Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure-Suspension, da Abweichungen auf degradierte Nukleinsäuren, Chemikalienreste des Aufreinigungsvorgangs oder Proteinverunreinigungen hinweisen. Für die Messung wurde eine entsprechende Referenzlösung (meist ddH₂O oder Puffer EB von Qiagen) als blank eingesetzt, und jeweils 1,5 µl pro Probe gemessen.

2.2.4.2 Arbeiten mit DNA

2.2.4.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Klonierung der vollständigen kodierenden Region des murinen Chemerin-Gens wurde der ORF (*open reading frame*) mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) aus muriner cDNA (*complementary DNA*) amplifiziert. Die dafür verwendete cDNA wurde mit Reverser Transkriptase, einem Enzym, das RNA in cDNA umschreiben kann, aus muriner Leber-RNA mit oligo-dT-Primern und *random hexamer*-Primern hergestellt (siehe Abs. 2.2.4.3.2). Für PCRs wurde generell der Q5® High-Fidelity 2x Master Mix von NEB verwendet, der bereits dNTPs, 2 mM MgCl₂ und die Q5-Polymerase in einem kompatiblen Puffer enthält. Durch ihre hohe Prozessivität (20-30 Sekunden pro kb), die 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität und eine mehr als 100-fach geringere Fehlerrate als die Taq-DNA-Polymerase können mit der thermostabilen Q5-Polymerase auch lange Amplikons mit hohem GC-Gehalt problemlos amplifiziert werden.

Der Standardansatz und das Temperatur- und Zeitprofil einer typischen PCR sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 5 Standardansatz für eine PCR.

Standardansatz PCR	
<i>Template</i>	150 – 200 ng
<i>Primer uni, 10 µM</i>	1,25 µl
<i>Primer rev, 10 µM</i>	1,25 µl
<i>Q5® High-Fidelity 2x Master Mix</i>	12,5 µl
<i>ddH₂O</i>	ad 25 µl
<i>Der Ansatz wurde je nach Bedarf hochskaliert</i>	

Tabelle 6 Temperatur- und Zeitprofil einer PCR mit Q5-Polymerase.

Temperatur- und Zeitprofil PCR mit Q5-Polymerase		
<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initiale Denaturierung	98°C	30 Sekunden
Denaturierung	98°C	10 Sekunden
Annealing	T ^m *	30 Sekunden
Elongation	72°C	20-30 Sekunden/kb
Schlusselongation	72°C	2 Minuten
Lagerung	4°C	∞
* T ^m = Schmelztemperatur der verwendeten Primer		

Die Schmelztemperatur der verwendeten Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculator (v 1.9.6, <http://tmcalculator.neb.com/#!/>) von NEB errechnet.

2.2.4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten nach ihrer Größe eingesetzt. Dabei wandern Nukleinsäuren aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-

Rückgrats in einem elektrischen Feld Richtung Anode durch ein Agarosegel, wobei Fragmente mit zunehmender Länge stärker von der Agarosematrix zurückgehalten werden. Dies resultiert in einer inversen Proportionalität der Laufgeschwindigkeit zur Länge der Nukleinsäuren, und einer effektiven und sauberen Trennung der Fragmente. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren im Agarosegel wurde der Benzimidazol-Fluoreszenzfarbstoff Roti®-GelStain verwendet, der nicht wie das mutagene Ethidiumbromid zwischen Basenstapeln der DNA interkaliert, sondern an die kleine Furche von spiralförmigen Nukleinsäuren bindet und zudem genauso sensitiv wie Ethidiumbromid ist.

Zum Gießen der Agarosegele wurden 1,5 – 3 g Agarosepulver (1-2%ige Gele) in 150 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, nach kurzem Abkühlen 7,5 µl Roti®-GelStain zugegeben und die Flüssigkeit in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt und die mit 6x Gel Loading Dye vermischten Proben in die Taschen geladen. Als Größenstandard wurden 10 µl des Quick-Load 100 bp DNA-Ladders oder des Quick-Load 1 kb DNA-Ladders aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für 45-60 Minuten. Die Dokumentation des Bandenmusters nach der Auftrennung geschah mit dem Chemidoc™ XRS+-System.

2.2.4.2.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente bestimmter Größe zu erhalten oder größere DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau zu eliminieren, wurde eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt, wobei die erwünschten Banden bei Visualisierung der DNA unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gelblock wurde mit dem Qiagen MinElute Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische Basensequenzen in DNA erkennen und durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen im Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA die Doppelstränge „schneiden“. Die Erkennungssequenz in der DNA ist typischerweise 4-8 Basen lang und wird innerhalb oder außerhalb dieser Abfolge von den Restriktionsenzymen geschnitten. Die dabei entstehenden Schnittstellen können entweder einen 5'-/3'-Überhang haben („sticky ends“) oder ohne Überhang („blunt ends“) sein.

Tabelle 7 Standardansatz eines Restriktionsverdaus.

Standardansatz Restriktionsverdau	
Template (dsDNA, Plasmid)	1 µg
10x Restriktionspuffer	1 µl
Restriktionsenzym(e)	je 1 Unit pro µg DNA
ddH ₂ O	ad 10 µl

Der Verdauansatz (s. Tabelle 7) wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, und die Enzyme anschließend, wenn möglich, laut Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hitzeinaktiviert. Bei größeren DNA-Mengen wurde der Ansatz entsprechend nach oben skaliert. Die Art des Restriktionspuffers wurde gemäß Herstellerangaben an die verwendeten Enzyme angepasst.

2.2.4.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau aufzureinigen und Rückstände wie z.B. Salze, Primer oder Enzyme zu entfernen, wurde das Qiagen MinElute PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase können lineare DNA-Fragmente, wie z.B. ein DNA-Insert und ein linearer Vektor, mit komplementären Schnittstellen ligiert werden. Zur Berechnung der einzusetzenden DNA-Mengen wurde der NEBioCalculator® (v 1.6.0, <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) verwendet, der anhand der Länge der DNA-Fragmente und dem Ligationsverhältnis (Vektor:Insert) die benötigte Menge der einzelnen Ligationspartner berechnet. Dies geschieht über folgende Formel:

$$\left(\frac{\text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} \right) \times \text{Vektormenge [ng]} \times \text{Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Insertmenge [ng]}$$

Tabelle 8 Standardansatz einer Ligation.

Standardansatz Ligation	
<i>Vektor</i>	50 – 100 ng
<i>Insert</i>	errechnete Menge DNA
<i>10x Ligase-Puffer</i>	2 µl
<i>T4-DNA-Ligase</i>	1 µl
<i>ddH₂O</i>	ad 21 µl

Der Ansatz (s. Tabelle 8) wurde dann für 15-20 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Für die Hitzeschock-Transformation der ligierten Plasmiden in *E. coli* wurden 5 µl des abgekühlten Ligationsansatzes eingesetzt, der restliche Ansatz wurde für eventuelle weitere Transformationen bei -20°C gelagert.

2.2.4.2.7 Sequenzierung bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific, Regensburg)

Zur Kontrolle der Richtigkeit der Sequenz mittels PCR hergestellter DNA-Inserts und aus cDNA amplifizierter DNA-Stücke der rt-PCR wurden sämtliche PCR- und Ligationsprodukte bei GeneArt sequenziert.

Dazu wurden nach Aufreinigung 20 ng pro 100 bp der zu sequenzierenden DNA, 10 µM des Sequenzierprimers und ddH₂O ad 8 µl in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt.

Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit Hilfe des *Pairwise Sequence Alignment* (EMBOSS Needle, http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) mit der annotierten Sequenz verglichen, und bei Produkten der rt-PCR die Sequenzidentität und –spezifität mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in Sequenzdatenbanken überprüft.

2.2.4.3 Arbeiten mit RNA

2.2.4.3.1 Isolation von RNA aus Zellen und Geweben mit TRIzol®

Zur RNA-Isolation aus Zellen oder Geweben wurde das Phenol- und Guanidin-Isothiocyant-haltige TRIzol® Reagenz verwendet. Bei dem hierbei angewandten Phenol-Chloroform-Extraktionsprinzip befinden sich RNA, DNA und Proteine von Gesamtzellhomogenisaten in unterschiedlichen Phasen, und die Abtrennung der RNA-haltigen wässrigen Phase mit anschließender Aufreinigung ergibt eine große Ausbeute qualitativ hochwertiger RNA [276].

Die Extraktion von RNA aus Zellen und Geweben fand auf Eis statt und es wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Filterspitzen verwendet.

Bei der RNA-Extraktion aus Zellen wurde zuerst der Überstand abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen, 500 µl TRIzol® auf die Zellen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom well-Boden abgeschabt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Extraktion der RNA aus Gewebe wurden kleine tiefgefrorene Gewebestücke in M-Tubes mit 1,5 ml TRIzol® mit dem gentleMACS™ Dissociator im Programm „RNA_02.01“ homogenisiert, und nach kurzer Zentrifugation in Reaktionsgefäße überführt.

Ab hier geschah die RNA-Extraktion aus Zellen und Geweben identisch.

Zur vollständigen Homogenisation und Scherung der genomischen DNA wurde die Suspension 3 – 5-mal in Insulinspritzen mit einer 27G-Kanüle (Außendurchmesser 0,4 mm) aufgezogen. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde das Reaktionsgefäß invertiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm abgefugt. Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, abgenommen, und die anderen Phasen verworfen. Anschließend wurden 50 µl Chloroform zugegeben, das Gefäß invertiert, für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm abgefugt.

Im nächsten Schritt wurde wiederum die obere klare Phase abgenommen, 200 µl 70%iger Ethanol zugegeben und die Suspension auf ein RNeasy Mini Spin Säulchen geladen. Die Zugabe des Ethanols führt zur Präzipitation der RNA, welche dann mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und eluiert wurde. Die Messung der RNA-Konzentration geschah mit dem Nanodrop. RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.3.2 Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um die Expression verschiedener Gene mittels semiquantitativer Real Time-PCR (rt-PCR) zu quantifizieren, muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit der Reversen Transkriptase, einem viralen Enzym, das RNA in die komplementäre DNA umschreiben kann. In dieser Arbeit wurde ein RT-System von Promega verwendet, bei dem die RNA durch die *Avian Myeloblastosis Virus*-Reverse Transkriptase (AMV-RT) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wird. Als Primer wurden hierzu *random hexamer*-Primer verwendet, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen und an komplementäre Sequenzen in der ganzen mRNA binden können. Der Standardansatz für die RT-PCR ist in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9 Standardansatz für eine Reverse Transkription (RT).
1x Reaktionsansatz RT-PCR**

25 mM MgCl ₂	8 µl
10x Reverse Transcriptions-Puffer	4 µl
10 mM dNTP-Mix	4 µl
random hexamer-Primer (0.5 µg/µl)	0,5 µl
RNasin® Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
AMV-Reverse Transkriptase (25 U/µl)	1 µl
1 µg RNA in RNase-freiem H ₂ O	21,5 µl
gesamt	40 µl

Die RT-PCR erfolgte für eine Stunde bei 42°C. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 5 Minuten abgestoppt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4.3.3 Real Time-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Mit der semiquantitativen Real Time-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR) ist es möglich, die mRNA-Expression verschiedener Gene in Echtzeit zu analysieren, was vor allem im Rahmen der Untersuchung von Prozessen, die die Expression von Genen beeinflussen, von großer Bedeutung ist. In dieser Arbeit wurde für die rt-PCR das Karussell-basierte LightCycler®-System mit Glaskapillaren von Roche benutzt. Zur Quantifizierung der Expression in Echtzeit wurde das LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit verwendet. Dieses beinhaltet neben der HotStart Taq DNA-Polymerase, dNTPs und dem geeigneten Reaktionspuffer den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der in die Doppelstränge der PCR-Produkte interkaliert. Dieser Komplex aus doppelsträngiger DNA und SYBR Green I emittiert Licht der Wellenlänge 521 nm, und die während der Reaktion in Echtzeit gemessene Fluoreszenz spiegelt somit die zum Messzeitpunkt vorhandene DNA-Menge wieder. Der Standardansatz und das normale Temperatur- und Zeitprofil einer typischen rt-PCR sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 10 Standardansatz für eine rt-PCR.

1x rt-PCR-Ansatz	
<i>LightCycler®-Mix</i>	2 µl
<i>25 mM MgCl₂</i>	2,4 µl
<i>Primer uni (5 pmol/µl)</i>	1 µl
<i>Primer rev (5 pmol/µl)</i>	1 µl
<i>cDNA (25 ng/µl)</i>	2 µl
<i>ddH₂O</i>	11,6 µl
<i>gesamt</i>	20 µl

Als Template wurde die durch die RT umgeschriebene cDNA verwendet, wobei direkt 2 µl des RT-Ansatzes ohne Aufreinigung für die rt-PCR eingesetzt wurden.

Tabelle 11 Temperatur- und Zeitprofil einer rt-PCR.

Temperatur- und Zeitprofil rt-PCR		
<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
<i>Initiale Hitzeaktivierung</i>	95°C	10 min
<i>Denaturierung</i>	95°C	15 s
<i>Annealing</i>	60°C	10 s
<i>Elongation</i>	72°C	10 s
<i>Fluoreszenzmessung</i>	variabel*	1 s
<i>Schmelzkurve</i>	60°C → 95°C	0,1°C/s
<i>Kühlung</i>	40°C	30 s

* die Messung der Fluoreszenz wurde bei einer für das PCR-Produkt spezifischen Temperatur durchgeführt

Durch eine initiale Inkubation bei 95°C wird die HotStart Polymerase aktiviert. Die 40-45 Zyklen zur Amplifikation der cDNA setzten sich jeweils aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden, dem Annealing bei 60°C für 10 Sekunden, der Elongation für 10 Sekunden bei 72°C und der Messung der Fluoreszenz am Ende jedes Zyklus zusammen. Die Temperatur, bei der die Fluoreszenz gemessen wurde, ist abhängig vom jeweiligen PCR-Produkt und wurde in Vorversuchen (sogenannte Primer-Tests, s. Abschnitt 2.2.4.3.4) ermittelt.

Nach der Amplifizierung der cDNA wurde eine Schmelzkurve erstellt, anhand derer man Aussagen über die Spezifität der Reaktion treffen kann. Beim langsamem Erhitzen des Reaktionsansatzes von 60°C auf 95°C (0,1°C pro Sekunde) dissoziieren die Doppelstränge der PCR-Produkte bei einer spezifischen Temperatur, die abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der DNA-Sequenz ist. Die Dissoziation der Doppelstränge zu Einzelsträngen führt zur Auflösung des DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes und einer damit einhergehenden abrupten Abnahme der emittierten Fluoreszenz. Ist die Abnahme der Fluoreszenz zwei- oder mehrstufig, deutet dies auf das Vorhandensein mehrerer PCR-Produkte in einer Reaktion hin.

Die relative Expression eines Gens wird über die Ausgangskonzentration der eingesetzten cDNA berechnet. Diese ist invers proportional zum sogenannten Crossing point (Cp-Wert), welcher durch die Zykluszahl dargestellt wird, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant höher ist als die Hintergrund-Fluoreszenz. Zur Bestimmung des Cp-Werts der einzelnen Proben werden die während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenzwerte gegen die Zykluszahl aufgetragen.

Um die Expression verschiedener Gene vergleichen zu können, wird eine Standardkurve benötigt, da somit mögliche Unterschiede in der Effizienz einzelner rt-PCRs berücksichtigt werden. Durch den Einsatz einer linearen Standardkurve können den Cp-Werten der Proben Zahlenwerte arbiträrer Einheit zugewiesen werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Quantifizierung ist die Normalisierung der errechneten Werte auf die Expression eines invarianten endogenen Referenzgens, des sogenannten Housekeepers. Ein Housekeeper-Gen wird unabhängig von Zelltyp, Zustand der Zelle und äußeren Einflüssen wie z.B. Stimulantien konstitutiv exprimiert und nicht reguliert. Für die Normalisierung wird der Quotient aus cDNA-Konzentration des GOI (*gene of interest*) und der cDNA-Konzentration des Housekeepers gebildet. Der Vergleich zweier normalisierter Werte zeigt Unterschiede im mRNA-Expressionsniveau eines Gens z.B. nach einer Stimulation auf.

2.2.4.3.4 Primer-Test für die Genexpressionsanalyse mittels rt-PCR

Da die Spezifität der Amplifikation von PCR-Produkten bei der rt-PCR der entscheidende Faktor ist, müssen die dafür verwendeten Primer in Vorversuchen auf Produktspezifität getestet werden und die geeignete Temperatur für die Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus' ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 8 Primerpaare zur semiquantitativen Genexpressionsanalyse designt (s. Abschnitt 2.1.9.1.1).

Die Primer für die rt-PCR wurden manuell oder mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche (https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html) designt und wiesen folgende Eigenschaften auf: Primerlänge ca. 20 Basenpaare, Amplikon von 70 – 250 Basenpaaren, Intron-umspannend, GC-Gehalt zwischen 45-60%, Schmelztemperatur ca. 60°C.

Die Primerpaare wurden in rt-PCRs mit cDNA aus unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen ausgetestet. Dabei wurde die Schmelzkurve analysiert, und die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetrennt. Bei einer spezifischen PCR zeigte sich nur eine DNA-Bande auf entsprechender Höhe auf dem Gel, welche dann ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gelstück eluiert wurde. Nach Sequenzierung der DNA wurden die Ergebnisse zur Überprüfung mit der annotierten Sequenz verglichen, und die Sequenzidentität in Datenbanken überprüft.

2.2.5 Arbeiten mit Proteinen

2.2.5.1 Proteinextraktion aus Zellen mit RIPA-Puffer

Zur Proteinextraktion aus Zellen wurde der RIPA-Puffer (*radioimmunprecipitation assay*) verwendet, der unter anderem die ionischen Detergentien SDS und Desoxycholat enthält, und deswegen stärker denaturierend wirkt als andere Lysepuffer.

Die Proteinisolation wurde auf Eis durchgeführt.

Bei Proteinextraktion aus Zellen wurde zuerst der Überstand abgenommen und für spätere Analysen wie z.B. die LDH-Messung aufgehoben. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, in 0,5-1 ml 1x PBS-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (PI) mit einem Zellschaber vom well-Boden abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, für 5 Minuten bei 4°C mit 4000 rpm und gleich anschließend für 1 Minute bei 8000 rpm abgefugt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe in 50-100 µl RIPA+PI resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Raumtemperatur wurden die Lysate für 10 s bei 20% Amplitude mit dem Ultraschallhomogenisator geschallt, um genomische DNA zu scheren und eventuelle DNA-Protein- oder Protein-Protein-Interaktionen zu zerstören. Anschließend wurde das Lysat für 5 Minuten bei 4°C mit 4000 rpm abzentrifugiert, das sich jetzt im Überstand befindliche Protein in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Zur Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurde eine 1:10-Verdünnung des Zelllysats eingesetzt. Zelllysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2 Proteinextraktion aus Geweben mit RIPA-Puffer

Zur Proteinextraktion aus Geweben wurde RIPA-Puffer verwendet, und die Proteinisolation auf Eis durchgeführt.

Zum gänzlichen Zellaufschluss und der Homogenisation wurden bei -80°C tiefgefrorene Gewebestücke direkt in M-Tubes (Miltenyi Biotec) gegeben, in die 1,5 ml RIPA+PI vorgelegt wurde, und mit dem gentleMACS™ Dissociator im Programm „Protein_01.01“ homogenisiert. Anschließend wurden die Tubes kurz abgefugt und das Lysat in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, in die 150 µl 10% Igepal und 7,5 µl 20% SDS vorgelegt wurde. Nach Inversion der Gefäße zur Vermischung des Lysats mit Igepal und SDS, wurde die Suspension dreimal je 10 Sekunden mit dem Ultraschallhomogenisator bei einer Amplitude von 25% geschallt. Zwischen den einzelnen Ultraschallvorgängen wurden die Reaktionsgefäße immer wieder auf Eis gekühlt, da durch die in der Suspension freigesetzte Ultraschallenergie in kleinen Volumina Hitze entsteht, die die Proteine denaturieren kann. Anschließend wurden die Lysate für 10 Minuten bei 4°C mit 13000 rpm abgefugt und der Überstand, in dem die Proteine gelöst sind, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei Lebern mit erhöhtem Fettgehalt bildete sich nach der Zentrifugation auf dem Überstand eine Fettschicht. Da Fett bei vielen weiteren proteinanalytischen Methoden hinderlich sein kann, wurde

der Überstand durch die Fettschicht hindurch vorsichtig abgenommen und erneut abzentrifugiert. Dies wurde bei Bedarf auch mehrere Male durchgeführt.

Für die Messung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurde eine 1:50-Verdünnung des Proteinlysats eingesetzt. Proteinlysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.3 Quantifizierung von Proteinen mittels BCA-Assay

Zur Quantifizierung von Proteinen nach Isolation aus Zellen oder Gewebe wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit verwendet, das nach dem Prinzip der kolorimetrischen Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure funktioniert [277]. Zur kolorimetrischen Quantifizierung wird die Eigenschaft von Proteinen, in basischen Lösungen über ihre Peptidbindungen quantitative Komplexe mit zweiwertigen Kupfer-Kationen zu bilden, genutzt, wobei diese zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Diese wiederum bilden einen violetten Komplex mit der im Reagenz enthaltenen Bicinchoninsäure, der proportional zur vorhandenen Proteinmenge in der Probe ist und bei einer Wellenlänge von 540 nm mit einem Photometer gemessen werden kann. Zur Quantifizierung des Proteingehalts der Proben wurde bei jedem BCA-Assay eine BSA (bovines Serum-Albumin)-Verdünnungsreihe als Standard mit gemessen. Aus den bekannten Proteinkonzentrationen des BSA-Standards und den jeweils gemessenen Absorptionswerten wurde mit dem Programm MPM6 von Bio-Rad eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Konzentration der Proben berechnet wurden.

Für den Assay wurden die Proben 1:10 (bei Leber 1:50) mit 1x PBS verdünnt, jeweils 10 µl der verdünnten Probe pro well in eine 96well-Platte pipettiert und 200 µl des fertigen BCA-Reagenz zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Platte bei 540 nm mit einem Photometer ausgelesen. Vom BSA-Standard wurden jeweils Doppelwerten und von den zu quantifizierenden Proben Dreifachwerte aufgetragen.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die hier verwendete Matrix besteht aus zwei Polyacrylamid-Gelen, die sich in ihrer Porengröße als auch dem pH-Wert unterscheiden. Zuerst wandern die Proteine aus den Taschen in das 5%ige Sammelgel mit neutralem pH, wo sie vor Übergang in das 15%ige basische Trenngel aufkonzentriert werden. Im Trenngel geschieht die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Zur Probenvorbereitung wurde 5x Lämmli-Puffer, der unter anderem β -Mercaptoethanol und SDS enthält, zum Lysat gegeben und die Probe für 5 Minuten aufgekocht. Dies führt zur Denaturierung und zerstört Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine, wozu auch das im Lämmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol durch Spaltung von Disulfidbrücken beiträgt [278]. Durch die Bindung von Kohlenwasserstoffen der SDS-Moleküle an hydrophobe Bereiche von Proteinen werden

diese unabhängig von ihrer Eigenladung negativ geladen, und migrieren im elektrischen Feld zur Anode. Zusätzlich stoßen sich die negativen Ladungen der SDS-Moleküle am Protein gegenseitig ab, was zusätzlich zur Linearisierung der Proteine beiträgt, sodass diese nur anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden [279].

Bei der Herstellung der Gele wurde zur Auslösung der Polymerisationsreaktion der Polymerisationsinitiator Ammoniumpersulfat und der Polymerisationskatalysator TEMED zu den Gellösungen gegeben. Zuerst wurde die Lösung für das 15%ige Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet, nach der Auspolymerisation der Alkohol abgekippt, die Lösung für das 5%ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und Taschenkämme für das spätere Beladen des Gels eingesetzt. Nach vollständiger Auspolymerisation wurden die vorbereiteten Proben in die Taschen geladen, die zuvor mit SDS-PAGE-Laufpuffer ausgespült wurden, um eventuelle Gelreste zu entfernen. Generell wurden pro Tasche 20 µg Proteinlysate geladen. Zur Größenkontrolle wurden 5 µl des Prestained Protein Marker V pro Spur geladen. Der Gellauf erfolgte für ca. 70 Minuten bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel.

2.2.5.5 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen, wo sie anschließend durch immunologische Interaktionen nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurden die Proteine mit dem Wettransfer-Verfahren mit Hilfe eines elektrischen Feldes von einem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Dazu wurde zuerst die PVDF-Membran in Methanol aktiviert, diese anschließend zusammen mit dem Gel, Whatmanpapier-Stücken und Schaumstoffpads in Wettransferpuffer equilibriert und ein „Blot-Sandwich“, bestehend aus einem Schaumstoffpad, zwei Whatmanpapier-Stücken, der Membran, dem Gel, wiederum zwei Whatmanpapier-Stücken und einem Schaumstoffpad, zusammengebaut. Dieses wurde dann in der richtigen Orientierung in die Blotting-Apparatur eingespannt und die Apparatur vollständig mit Wettransfer-Puffer gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 90 Minuten bei einer Spannung von 80 V.

Danach erfolgte die Blockierung der Membran, wobei die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5%iger Blockierlösung geschwenkt wurde. Dabei werden unbesetzte Bindestellen auf der Membran blockiert, um unspezifische Bindungen der zur Detektion benutzten Antikörper an die Membran zu verhindern. Dann wurde die Membran viermal für je 15 Minuten mit TBS-T gewaschen und im Anschluss mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die primären Antikörper wurden nach Herstellerangaben oder Erfahrungswerten in Antikörperlösung verdünnt eingesetzt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Der sekundäre Antikörper, an den eine *horseradish peroxidase* (HRP) als Reporterenzym gekoppelt ist, wurde generell 1:5000 in 5%iger Blockierlösung verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 10 Minuten, wurde die Membran noch zweimal für je 5 Minuten mit 1x TBS gewaschen. Zur anschließenden Immundetektion über die gekoppelte HRP wurde das ECL Prime WB Detection Reagent nach Herstellerangaben verwendet. Die Dokumentation der resultierenden Chemilumineszenzsignale geschah mit dem ChemidocTM XRS+-System.

2.2.5.6 Coomassie-Färbung

Coomassie ist ein Farbstoff, der an Seitenketten von Aminosäuren bindet, und kann so zur Anfärbung des Gesamt-Proteins in einem Polyacrylamidgel oder auf einer Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) verwendet werden. Coomassie färbt Proteine unabhängig von der Aminosäuresequenz gleichmäßig blau-violett, und kann als Kontrolle der Beladung eines SDS-Gels herangezogen werden.

Zur Färbung von Polyacrylamidgelen oder PVDF-Membranen wurden diese 30-60 Minuten in Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution geschwenkt. Anschließend wurde das Gel oder die Membran in einem Gemisch aus ddH₂O und Ethanol oder der Coomassie-Entfärberlösung gewaschen, um überschüssige Farbe zu entfernen und die Färbung der Proteinbanden sichtbar zu machen. Gefärbte Gele und PVDF-Membranen wurden nach dem Entfärben dokumentiert und die Membranen auf Whatmanpapier getrocknet.

2.2.5.7 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen in Lösungen. Die meisten hier in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits funktionieren nach dem Prinzip des Sandwich-ELISAs, bei dem das zu detektierende Antigen an einen immobilisierten Antikörper (*coating/capture antibody*) bindet. Zur Detektion wird ein zweiter Antikörper (*detection antibody*) zugegeben, der an ein anderes Epitop des Antigens bindet und Biotin-gekoppelt ist. Durch Zugabe von Streptavidin-HRP wird der Detektions-Antikörper über die Streptavidin-Biotin-Interaktion indirekt an HRP gekoppelt, welche anschließend zugegebenes farbloses Substrat quantitativ in farbiges Produkt umsetzt. Nach Abstoppen der Enzymreaktion durch die Stopplösung (H₂SO₄) wird die Absorption bei 450 nm mit Hintergrundkorrektur bei 540 nm gemessen. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde bei jedem ELISA eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration des zu quantifizierenden Proteins mit gemessen.

Die Quantifizierung von Chemerin in humanen und murinen Serumproben und von Adiponectin in murinen Serumproben wurde mit DuoSet®-ELISAs von R&D Systems durchgeführt, die nach dem

Sandwich-Prinzip funktionieren. Bei diesen ELISAs wurde die Platte selbst gecoatet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Quantifizierung von Insulin in Mäuseseren geschah mit dem Insulin-ELISA von Mercodia, und die Quantifizierung der ALT in murinen Serumproben wurde mit dem ALT-ELISA von USCNK Cloud Clone durchgeführt. Beide ELISA-Kits funktionieren nach dem Sandwich-Prinzip funktioniert, und die Assays wurden mit den bereits gecoateten Platten nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Quantifizierung von Hepcidin im Überstand primärer humaner Hepatozyten, die mit Chemerin stimuliert wurden, wurde mit dem Hepcidin-ELISA von DRG Diagnostics durchgeführt. Dieser bereits gecoatete ELISA funktioniert nach dem Prinzip eines kompetitiven ELISAs, bei dem das im Überstand zu messende Hepcidin mit Biotin-konjugiertem Hepcidin um die Bindung an die immobilisierten Antikörper auf der Platte konkurriert. Nach anschließender Zugabe von Streptavidin-HRP und Substrat kann durch die Messung der Intensität des Chemilumineszenzsignals die Menge des verdrängten Hepcidin-Biotin-Konjugats ermittelt werden, was einen direkten Rückschluss auf die Menge des im Überstand enthaltenen Hepcidins zulässt.

2.2.5.8 Immunpräzipitation von Chemerin-Protein aus Leberproteinlysate für die Massenspektrometrie

Um nach der AAV-vermittelten hepatischen Überexpression der Chemerin-Isoformen Chemerin162 und Chemerin156 die weitere Prozessierung zu Isoformen mit möglicherweise unterschiedlicher Aktivität zu untersuchen, wurde Chemerin-Protein aus den Leberlysaten präzipitiert und anschließend mittels Massenspektrometrie untersucht.

Für die Präzipitation wurde das PierceTM Classic Magnetic IP/Co-IP Kit verwendet. Bei diesem Kit wird der Komplex aus dem zu präzipitierendem Antigen und dem Präzipitations-Antikörper über die spezifische Bindung der Fc-Domäne des Immunglobulins an ein rekombinantes Protein A/G-Fusionsprotein, das an magnetische Kügelchen gekoppelt ist, über einen Magneten aus Lysat o.ä. präzipitiert.

Dazu wurden je 200 mg tiefgefrorenes Lebergewebe in 1 ml IP Lyse/Wasch-Puffer, zu dem Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (PhosSTOPTM Phosphatase Inhibitor Cocktail und cOmpleteTM Mini Protease Inhibitor Cocktail) zugesetzt wurden, in M-Tubes mit dem gentleMACSTM Dissociator im Programm „RNA frozen“ homogenisiert. Nach kurzer Abzentrifugation wurde das Lysat in Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten bei 13000 rpm abgefugt. Da es sich bei den verwendeten Lebergewebsproben um Stücke von Fettlebern handelte, bildete sich durch die Zentrifugation eine Fettschicht auf dem Überstand, in dem sich die Proteine befanden. Da Fett bei der weiteren Analyse hinderlich sein könnte, wurde der Überstand ohne Fettschicht vorsichtig mit einer Spritze und einer feinen Kanüle aufgesogen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay wurde eine 1:10- und eine 1:50-Verdünnung des Proteinlysats eingesetzt.

Die Immunpräzipitation fand am gleichen Tag wie die Lyse der Leberproben statt, das restliche Lysat wurde bei -80°C gelagert.

Zur Bildung des Immunkomplexes aus Antigen und Antikörper wurden 1000 µg Protein des Leberlysats und 10 µg des murinen Chemerin-Antikörpers AF2325 von R&D eingesetzt. Der Ansatz wurde mit IP Lyse/Wasch-Puffer auf 500 µl aufgefüllt, mehrere Male vorsichtig invertiert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die manuelle Immunpräzipitation wurden 25 µl der Pierce Protein A/G Magnetic Beads in einem Reaktionsgefäß mit 175 µl IP Lyse/Wasch-Puffer gewaschen und das Reaktionsgefäß in einen magnetischen Ständer gestellt, wobei die magnetischen Kügelchen an der Seite des Gefäßes festgehalten wurden und der Waschpuffer abpipettiert werden konnte. Der Waschvorgang wurde mit 1 ml Waschpuffer wiederholt, der über Nacht inkubierte Mix aus Lysat und Antikörper zu den gewaschen Kügelchen gegeben und das Reaktionsgefäß für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt (600-800 rpm). Danach wurde mit Hilfe des Magnet-Ständers die restliche ungebundene Probe abgenommen und die Kügelchen (mit gebundenem Antikörper-Antigen-Komplex) dreimal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen mit 500 µl ddH₂O gewaschen, der Überstand abpipettiert und 100 µl des Lane Marker Sample Buffers, der vorher 1:5 in ddH₂O verdünnt wurde, zu den Kügelchen gegeben. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht, wobei das Antigen vom Antikörper, welcher dabei denaturiert, eluiert wird. Der das präzipitierte Antigen beinhaltende Überstand wurde abpipettiert und die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Als Negativkontrolle wurden Leberlysatsproben ohne Chemerin-Antikörper und der Chemerin-Antikörper ohne Leberlysats mit den magnetischen Kügelchen inkubiert.

Zur massenspektrometrischen Analyse der Aminosäuresequenz der präzipitierten Chemerin-Proteine wurden 35 µl des IP-Eluats auf ein SDS-Gel geladen, nach erfolgter Auftrennung mit Coomassie gefärbt und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die massenspektrometrische Analyse wurde durch Dr. Astrid Bruckmann aus der *core facility* der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Deutzmann durchgeführt.

Parallel dazu wurden die Proben auch auf ein weiteres SDS-Gel geladen, um mit der anschließenden Western Blot-Analyse die Richtigkeit und Effektivität der Immunpräzipitation zu untersuchen.

2.2.5.9 Messung der Bioaktivität von Chemerin im Serum mittels Tango-Assay

Die Messung der Menge an bioaktivem Chemerin im Serum der Mäuse bei Überexpression von Chemerin162 und Chemerin156 wurde im Rahmen einer Kooperation von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christopher Sinal der Dalhousie Universität in Halifax (Nova Scotia, Kanada) mittels des Tango-Assays durchgeführt. Bei diesem Assay führt die Aktivierung der Chemerin-Rezeptoren CMKLR1 oder GPR1 durch bioaktives Chemerin in den Serumproben zur Kern-Translokation eines nicht-nativen Transkriptionsfaktors, was die Expression eines Reportergens induziert und letztlich zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge führt [191]. Die Konzentration an bioaktivem Chemerin in den Serumproben wurde dann aus den gemessenen Emissionswerten anhand einer Standardkurve errechnet. Die Standardkurve wurde durch die Messung einer Verdünnungsreihe von rekombinantem murinen Chemerin156 erstellt.

2.2.6 Messung von Triglyzeriden in Seren und Leberlysaten

Triglyzeride sind Ester des dreifachen Alkohols Glycerin mit langkettigen Fettsäuren und spielen als Hauptbestandteil des Körperfetts eine wichtige Rolle, vor allem auch bei pathologischen Vorgängen. Die Menge der Triglyzeride in Seren und Leberlysaten wurde mit einem kolorimetrischen Triglyzerid-GPO-PAP-Assay von Roche ermittelt. Das Testprinzip beruht auf einer Reihe enzymatischer Reaktionen, an deren Ende die Bildung eines roten Farbstoffes steht, dessen Absorption bei 540 nm proportional zur Menge der einstmals in der Probe vorhandenen Triglyzeride ist.

Zuerst werden die Triglyzeride durch die Lipoproteinlipase in Glycerol und Fettsäuren gespalten. Das freigesetzte Glycerol wird mit ATP durch die Glycerolkinase zu Glycerol-3-phosphat und ADP umgesetzt, welches in der darauffolgenden Reaktion von der Glycerolphosphatoxidase (GPO) mit O_2 zu Dihydroxyazeton, Phosphat und H_2O_2 umgewandelt wird. Das gebildete H_2O_2 wird mit 4-Chlorophenol und 4-Aminophenazon (PAP) durch eine Peroxidase zu H_2O , HCl und dem roten Farbstoff 4-(p-Benzoquinone-monoimino)-phenazon umgesetzt [280].

Zur Messung der Triglyzeride wurden 5 μ l Serum oder Lysat eingesetzt und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.7 Messung von Cholesterin in Seren und Leberlysaten

Das Sterin Cholesterin ist wichtiger Bestandteil der Plasmamembran und zudem das Ausgangsprodukt für die Synthese mehrerer Steroidhormone und Gallensäuren [281]. Um die Menge an Cholesterin in Seren und Leberlysatenproben zu bestimmen, wurde ein kolorimetrischer CHOD-PAP-Test verwendet, bei dem eine Reihe enzymatischer Reaktionen zur Bildung eines roten Farbstoffes führt, dessen Absorption bei 540 nm proportional zur Menge des einstmals in der Probe vorhandenen Cholesterin ist.

Physiologisch liegt Cholesterin vor allem als Cholesterinester der Fettsäuren vor. Im ersten Schritt des Assays werden deswegen Cholesterinester durch die Cholesterinesterase in Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Im zweiten Schritt werden Cholesterin und O_2 durch die Cholesterinoxidase (CHOD) zu Cholestenon und H_2O_2 umgesetzt. In der Folgereaktion wird das gebildete H_2O_2 mit 4-Chlorophenol und 4-Aminophenazon (PAP) durch eine Peroxidase zu H_2O , HCl und dem roten Farbstoff 4-(p-Benzoquinone-monoimino)-phenazon umgewandelt [282].

Zur Messung des Cholesteringehalts wurden 4 μ l Serum oder Lysat eingesetzt und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.8 Messung von Glukose in Seren

Glukose ist ein wichtiger Energieträger und die Glukosemenge in verschiedenen Körperflüssigkeiten ein bedeutender Parameter in der Diagnose vieler Stoffwechselkrankheiten. Zur Bestimmung der Glukosekonzentration im Serum wurde in dieser Arbeit das QuantiChrom™ Glucose Assay Kit verwendet. Bei diesem Test bildet in der Probe enthaltene Glukose mit o-Toluidin stöchiometrisch einen grün-blauen Komplex, der bei 630 nm absorbiert. Der Assay wurde mit Serumproben nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.9 Histologische Untersuchung von Leberschnitten mit Hämalaun & Eosin-Färbung

Bei der Präparation von Versuchstieren wurde der mittlere linke Leberlappen (*Lobus medialis sinister*) für histologische Untersuchungen gleich nach der Entnahme in Biopsie-Einbettkassetten gelegt und in 4% Formalinlösung fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden von den Proben mit dem Mikrotom 3-5 μ m dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger aufgezogen wurden. Zur Unterscheidung der einzelnen Gewebestrukturen und zur genaueren Untersuchung der Morphologie der Leberzellen wurden die Schnitte mit Hämalaun und Eosin angefärbt (H&E-Färbung). Dabei färbt der basische Farbstoff Hämalaun basophile Strukturen im Gewebe wie Zellkerne und Ribosomen violett-blau, und der saure Farbstoff Eosin färbt eosinophile Strukturen wie Zellplasma, Mitochondrien und Kollagen rötlich-pink [283].

Für die H&E-Färbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern zuerst für 20 Minuten bei 60°C inkubiert, um das Paraffin anzuschmelzen. Dann wurden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten in Histol entparaffiniert, und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Nach Inkubation in destilliertem Wasser für 5 Minuten wurden die Schnitte für 5 Minuten in Hämalaun gefärbt und durch Waschen in Leitungswasser gebläut. Dann wurden die Schnitte für 5 Minuten mit Eosin gegengefärbt, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und durch Histol geklärt. Die Schnitte wurden dann mit dem Schnelleindeckmittel Entellan® eingedeckt und über Nacht getrocknet.

Die H&E-gefärbten Leberschnitte wurden dann mit dem Konfokalmikroskop D-Eclipse C1 von Nikon dokumentiert.

2.2.10 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der Daten dieser Arbeit geschah mit der Statistik- und Analyse-Software SPSS 22.0 (IBM, Armonk, USA) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 und 2013 (Microsoft Corporation, Redmonk, USA).

Die Daten sind angegeben als Mediane oder als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde bei ungepaarten Proben mit dem beidseitigen Mann-Whitney-U-Test, bei gepaarten Proben mit dem t-Test ermittelt, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen wurde. Zur Analyse von Assoziationen wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Grafisch dargestellt wurden die Daten in Balkendiagrammen, Streudiagrammen und Boxplot-Diagrammen, in denen der Median, das erste und das dritte Quartil und der gesamte Wertebereich angezeigt werden. Ausreißer werden dabei als Sterne und Kreise dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Chemerin in der humanen nicht-alkoholischen Steatohepatitis

Der systemische Chemerinspiegel ist bei Übergewicht beim Menschen und bei Nagetieren erhöht, was wahrscheinlich mit einem Anstieg der Synthese im Fettgewebe zusammenhängt [284]. Zudem korreliert Chemerin im Blut positiv mit Kennzeichen des metabolischen Syndroms wie z. B. der Insulinresistenz und dem Bluthochdruck [285], und der systemische Spiegel kann durch Gewichtsabnahme wieder reduziert werden [250].

Als Krankheitsbild mit komplexer Entstehungsgeschichte wird die NAFLD oft als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms bezeichnet.

Vor allem in der NAFLD scheint die Regulation der Expression von Chemerin und des systemischen Chemerin-Spiegels von vielen verschiedenen physiologischen Faktoren und Parametern abhängig zu sein, da es dafür in der NASH im Speziellen und der NAFLD im Allgemeinen generell kontroverse Daten, basierend auf humanen Kohorten-Studien und Experimenten mit Diät-induzierter NAFLD in Nagetieren, gibt.

Gründe dafür könnten unter anderem die bei den Studien zum Großteil vorhandenen signifikanten Unterschiede im Body-Mass-Index zwischen Patienten- und Kontrollgruppe innerhalb der Studie oder der Studien untereinander sein. Meist gibt es bei diesen Kohorten auch nur eine geringe Zahl an Patienten mit definitiver NASH-Diagnose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in Proben einer Patienten-Kohorte mit mittels Biopsie gestellter NAFLD-Diagnose die hepatische Expression von Chemerin auf mRNA-Ebene untersucht (Charakterisierung der Kohorte s. Abschnitt 2.2.1.1).

In Blutproben einer zweiten Kohorte aus Patienten mit Ultraschall-gesicherter NAFLD-Diagnose wurde der systemische Chemerinspiegel in der NAFLD ermittelt (Charakterisierung der Kohorte s. Abschnitt 2.2.1.2).

Ein maßgebliches Detail bei dieser Studie von Chemerin in der NAFLD ist die Tatsache, dass der Body-Mass-Index der Probanden beider Kohorten untereinander vergleichbar ist und sich nicht signifikant voneinander unterscheidet.

Weiterhin wurde für diese Studie auch die Auswirkung von Substanzen, die die Synthese und Homöostase von Lipiden, Cholesterin und Glukose in der Leber beeinflussen, auf die Chemerin-Expression und –Sekretion von HepG2-Zellen und der hepatischen Sternzelllinie LX-2 untersucht.

Die Ergebnisse der Versuche dieses Kapitels wurden im Artikel „*Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis*“ im November 2016 im *European Journal of Clinical Investigation* veröffentlicht [286].

3.1.1 Untersuchung der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression in der humanen NAFLD

In einer Kohorte bestehend aus 109 Probanden, zusammengesetzt aus 33 Kontrollen, 39 Patienten mit Hepatosteatose und grenzwertiger NASH und 37 Patienten mit definitiver NASH-Diagnose wurde mittels rt-PCR die Expression von Chemerin auf mRNA-Ebene in gesundem Lebergewebe untersucht (s. Abschnitt 2.2.1.1).

Der Schweregrad der Lebererkrankung wurde anhand des im Jahr 2005 von D. E. Kleiner und Kollegen entwickelten Scorings-Systems zur einheitlichen Einstufung des breiten Spektrums der NAFLD bestimmt. Dabei wird durch die Beurteilung der Art und des Umfangs typischer histologischer NAFLD-Merkmale wie Steatose, Entzündung und Fibrose der Leber ein *NASH activity score* (NAS) errechnet, und so die Stellung objektiver Diagnosen bei NAFLD ermöglicht [26].

Bei der Messung der Chemerin-Expression zeigte sich jeweils eine signifikante Reduktion zwischen der Kontrollgruppe (NAS = 0) und Patienten mit grenzwertiger NASH (NAS < 5) zu den Patienten mit definitiver NASH (NAS ≥ 5) (s. Abb. 4 A).

Die hepatische Chemerin-Expression korrelierte dabei mäßig negativ mit dem Entzündungs-Score ($\rho = -0,227$, $p = 0,018$) und dem Fibrose-Score ($\rho = -0,214$, $p = 0,027$) (s. Abb. 4 B, C). Zwischen dem Steatosegrad der Leber und der Expression gab es keine Korrelation [286].

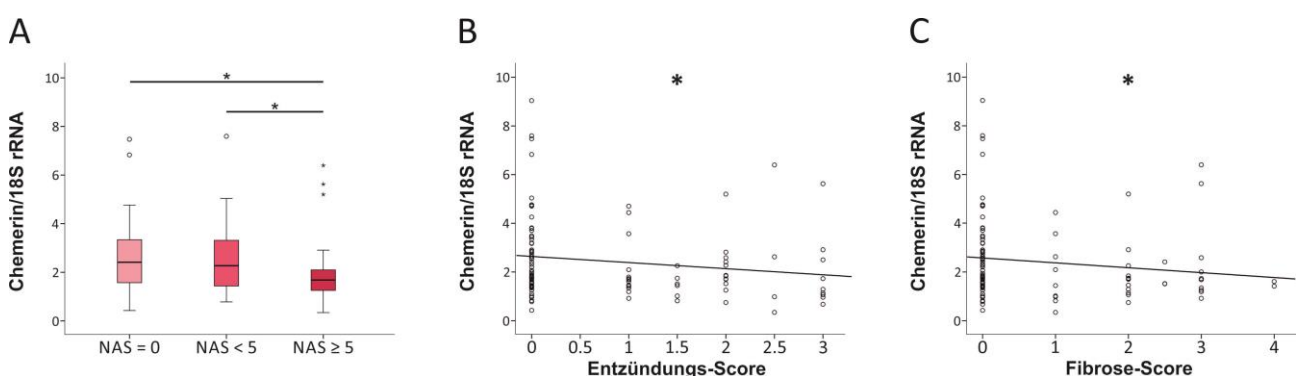


Abbildung 4 Hepatische Chemerin-mRNA-Expression bei unterschiedlichem Ausprägungen der NAFLD.

(A) Chemerin-Expression bei gesunden Kontrollen (NAS = 0, n = 33), Patienten mit grenzwertiger NASH (NAS < 5, n = 39) und Patienten mit definitiver NASH (NAS ≥ 5, n = 37). (B) Korrelation der hepatischen Chemerin-Expression mit dem Entzündungs-Score in der NAFLD. (C) Korrelation der hepatischen Chemerin-Expression mit dem Fibrose-Score in der NAFLD. Normalisierung der Chemerin-Expression auf 18S rRNA. NAS, *NASH activity score*. * $p < 0,05$.

Im Rahmen dieser Studie zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Chemerin-Expression zwischen den 54 Frauen und 55 Männern (s. Abb. 5 A). Auch gab es keinen

Expressionsunterschied zwischen normalgewichtigen ($\text{BMI} \leq 25$, $n = 37$), übergewichtigen ($\text{BMI} > 25 - < 30$, $n = 40$) und adipösen Patienten ($\text{BMI} \geq 30$, $n = 32$) (s. Abb. 5 B).

Die Kontrollgruppe der Patienten mit einem *NASH activity score* von 0 bestand aus 17 normalgewichtigen, 13 übergewichtigen und 3 adipösen Probanden. Auch innerhalb dieser Kontrollgruppe gab es zwischen den Patienten unterschiedlicher BMI-Kategorien keinen Unterschied in der Chemerin-Expression [286].

Weiterhin hatten auch Komorbiditäten wie Bluthochdruck ($n = 41$) und Typ-2-Diabetes ($n = 14$) keinen Einfluss auf die Chemerin-Expression (s. Abb. 5 C, D).

Auch bei 12 Patienten mit Hypercholesterinämie unterschied sich die hepatische Expression von Chemerin nicht von Probanden mit normalem Cholesterinspiegel [286].

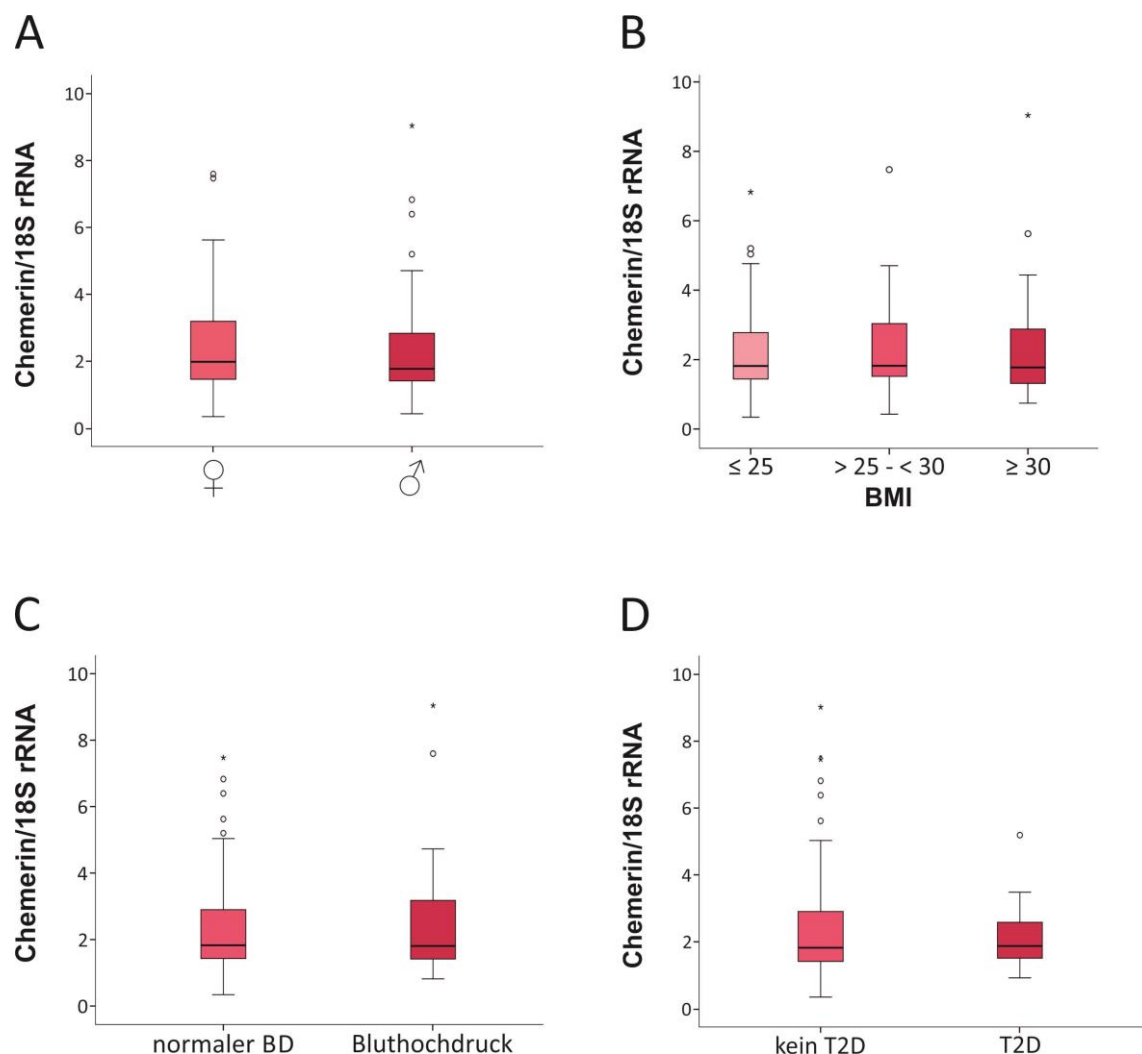


Abbildung 5 Untersuchung der Assoziation der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression in der NAFLD mit Geschlecht, BMI, Blutdruck und Typ-2-Diabetes. (A) Chemerin-Expression in der NAFLD bei Frauen ($n = 54$) und Männern ($n = 55$). **(B)** Chemerin-Expression bei normalgewichtigen Probanden ($\text{BMI} \leq 25$, $n = 37$), übergewichtigen Probanden ($\text{BMI} > 25 - < 30$, $n = 40$) und adipösen Probanden ($\text{BMI} \geq 30$, $n = 32$). **(C)** Chemerin-Expression bei Patienten mit normalem Blutdruck (BD, $n = 68$) und Bluthochdruck ($n = 41$). **(D)** Chemerin-Expression bei Patienten ohne ($n = 95$) und mit Typ-2-Diabetes (T2D, $n = 14$). Normalisierung der Chemerin-Expression auf 18S rRNA. *BMI*, Body-Mass-Index; *BD*, Blutdruck; *T2D*, Typ-2-Diabetes.

3.1.2 Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD

In einer zweiten Kohorte aus 56 Probanden, von denen 24 eine Ultraschall-gesicherte NAFLD-Diagnose hatten, wurde der systemische Chemerinspiegel in der NAFLD untersucht (s. Abschnitt 2.2.1.2).

Anthropometrische Daten wie Alter, BMI und das Taille-Hüft-Verhältnis (*Waist-to-hip ratio*, WHR), und der Blutdruck war bei Probanden beider Versuchsgruppen vergleichbar (s. Tabelle 2 in Abschnitt 2.2.1.2) [286].

Bei Patienten mit NAFLD zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Ferritin-Menge im Serum im Vergleich zur Kontrollgruppe (204 ng/ml zu 78 ng/ml, $p = 0,011$). Zudem wurde in der NAFLD eine signifikante Reduktion des systemischen Adiponectin-Spiegel beobachtet (2,7 $\mu\text{g/ml}$ zu 4,1 $\mu\text{g/ml}$ in der Kontrollgruppe, $p = 0,031$) [286].

Bei der Untersuchung des Chemeringehalts im Serum der Probanden mittels ELISA ergab sich kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (s. Abb. 6 A).

Auch das Geschlecht oder Komorbiditäten wie Typ-2-Diabetes hatten keinen Einfluss auf die Chemerinmenge im Blut [286].

Mäßige Korrelationen wurden für die systemische Chemerinmenge mit dem Taille-Hüft-Verhältnis ($\rho = 0,276$, $p = 0,041$) und mit der Transferrinsättigung ($\rho = -0,314$, $p = 0,018$) beobachtet (s. Abb. 6 B, C). Zudem ergaben sich weitere Korrelationen des Chemerinspiegels mit dem Alter der Probanden ($\rho = 0,378$, $p = 0,004$) und dem systolischen Blutdruck ($\rho = 0,366$, $p = 0,006$) [286].

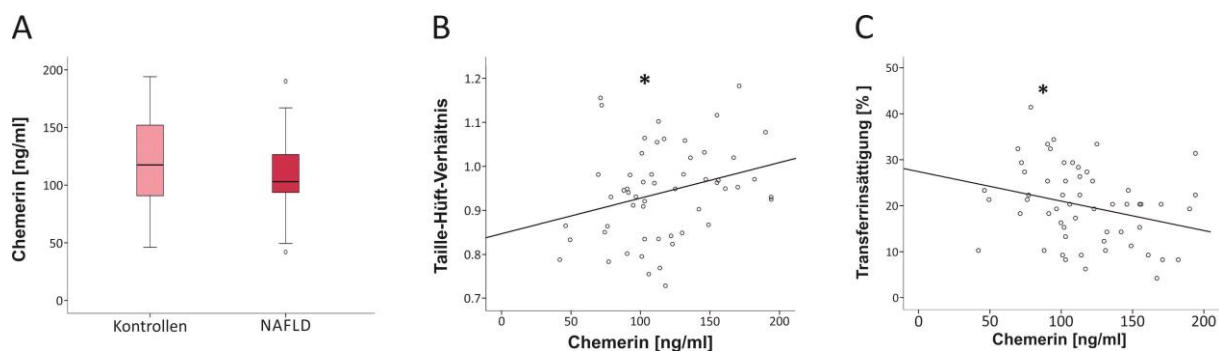


Abbildung 6 Systemischer Chemerinspiegel in der NAFLD. (A) Der systemische Chemerinspiegel von gesunden Kontrollen ($n = 32$) und Patienten mit Ultraschall-gesicherter NAFLD-Diagnose ($n = 24$). **(B)** Positive Korrelation des systemischen Chemerinspiegels mit dem Taille-Hüft-Verhältnis. **(C)** Negative Korrelation des systemischen Chemerinspiegels mit der Transferrinsättigung. * $p < 0,05$.

Weiterhin konnten jeweils mäßige positive Korrelationen des Serum-Chemerins mit dem systemischen *fibroblast growth factor* 21 (FGF21)- ($\rho = 0,296$, $p = 0,027$) und Lipocalin2-Spiegel ($\rho = 0,316$, $p = 0,018$) beobachtet werden [286].

3.1.3 Einfluss von Chemerin auf die Regulation von Hecpudin und FGF21 in primären humanen Hepatozyten

Etwa ein Drittel aller NAFLD-Patienten haben einen erhöhten hepatischen Eisengehalt aufgrund von Störungen in der Regulation des Eisenexports und der Kontrolle des hepatischen Eisenspiegels [287, 288]. Hauptgrund dafür ist die pathologische Induktion der hepatischen Expression von Hecpudin in der NAFLD, da Hecpudin als wichtiger Regulator der Eisenhomöostase fungiert und unter anderem den Eisenexport inhibiert [288, 289]. Die Expression von Hecpudin wird durch Entzündungsvorgänge und chronische Erkrankungen drastisch erhöht, und führt zu einer Störung des Eisenexports aus der Leber und der Aufnahme aus dem Dünndarmepithel in den Blutkreislauf [287, 288].

Dies wiederum kann letztendlich zu einer Eisenmangelanämie führen, die bei NAFLD und auch in der Adipositas eine oft auftretende Folgeerkrankung/Komorbidität darstellt, da auch bei adipösen Individuen der systemische Hecpudin-Spiegel im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrollen signifikant erhöht ist [290].

Bei der Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD ergab sich eine negative Korrelation der Transferrinsättigung im Blut mit dem systemischen Chemerinspiegel (s. Abb. 6 C). Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Chemerin auf die Regulation der Eisenhomöostase in der Leber wurde die Expression von Hecpudin genauer betrachtet. Dazu wurde die mRNA-Expression von primären humanen Hepatozyten dreier Spender, die mit ansteigenden Chemerin-Konzentrationen stimuliert wurden, analysiert und die Menge an sezerniertem Hecpudin-Protein im Überstand dieser Hepatozyten gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von Hecpudin bei der Stimulation der Zellen mit 600 ng/ml rekombinantem humanen Chemerin (rhChemerin) (s. Abb. 7 A). Bei der Untersuchung der Menge an Hecpudin im Überstand dieser Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Chemerinkonzentrationen festgestellt werden (s. Abb. 7 B).

Im Rahmen der Messung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD ergab sich auch eine positive Korrelation mit dem systemischen FGF21-Spiegel (s. Kap. 3.1.2) [286], einem Regulator der Glukosehomöostase [291].

Bei der Untersuchung der Menge an FGF21 im Überstand der primären humanen Hepatozyten nach Stimulation mit rhChemerin zeigte sich teilweise eine sehr signifikante Erhöhung von FGF21 im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 7 C).

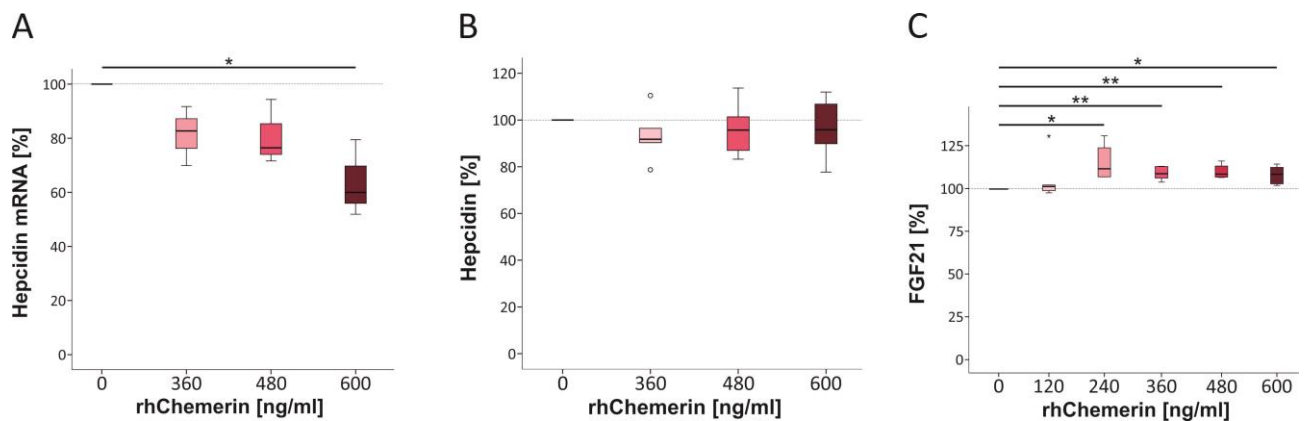


Abbildung 4 Einfluss von Chemerin auf Hepcidin und FGF21 in primären humanen Hepatozyten.

(A) Hepcidin-mRNA-Expression bei Stimulation primärer humaner Hepatozyten dreier verschiedener Spender mit rhChemerin. (B) Hepcidin-Protein im Überstand primärer humaner Hepatozyten drei verschiedener Spender nach Stimulation mit rhChemerin. (C) FGF21-Proteinmenge im Überstand primärer humaner Hepatozyten drei verschiedener Spender nach Stimulation mit rhChemerin. Die Werte sind jeweils im Vergleich zu den Kontrollinkubierten Zellen in % angegeben. *rhChemerin*, rekombinantes humanes Chemerin. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.4 Einfluss von Regulatoren der hepatischen Lipid- und Glukose-Homöostase auf die Expression von Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Bei der Untersuchung des systemischen Chemerin-Spiegels in der NAFLD zeigte sich unter anderem auch, dass der Chemerinspiegel signifikant mit dem FGF21-Gehalt des Blutes korreliert (s. Kap. 3.1.2). Zudem führte die Stimulation primärer humaner Hepatozyten mit rhChemerin zum Anstieg des FGF21-Gehalts im Überstand (s. Abb. 7 C). Als Regulator der Glukose- und Lipidhomöostase spielt FGF21 eine wichtige Rolle, und da der hepatische Lipid- und Glukose-Metabolismus eng mit dem inflammatorischen und proliferativen Signalling in der Leber verknüpft ist, sollte die Rolle von Chemerin dabei näher betrachtet werden.

Dazu wurde die Auswirkung auf die Expression und Sekretion von Chemerin bei Stimulation der Hepatozyten-Zelllinie HepG2 und der hepatischen Sternzelllinie LX-2 mit Faktoren, die die hepatische Lipid- und Glukosehomöostase beeinflussen, untersucht.

3.1.4.1 Einfluss des LXR-Agonisten T0901317 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Liver X receptors (LXR) sind nukleäre Rezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der hepatischen Lipogenese und Glukosehomöostase spielen. Der Hauptligand von LXR ist oxxygeniertes Cholesterin, das Oxysterol, das bei Akkumulation in der Leber zur Pathophysiologie der NAFLD beiträgt [292]. Die Bindung von Oxysterol an LXR führt zur Induktion der Expression von Proteinen, die die Leber durch Modulation des Cholesterinmetabolismus vor den toxischen Effekten, die mit der Anhäufung der Cholesterin-Derivate einhergehen, schützen [293].

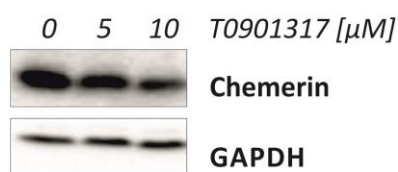
Um den Einfluss der Aktivierung von LXR-Rezeptoren auf die Expression von Chemerin zu untersuchen, wurden HepG2- und LX-2-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des synthetischen LXR-Agonisten T0901317 stimuliert.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Chemerin-Expression auf Proteinebene bei Stimulation von HepG2-Zellen mit 10 μM T0901317 ($2,0 \pm 0,7$ zu $1,0 \pm 0,6$, $p = 0,02$) im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 8 A) [286]. Bei der Untersuchung der sezernierten Menge Chemerin im Überstand nach Stimulation mit T0901317 ergab sich eine zum Teil hoch signifikante Reduktion des Chemerin-Proteins (s. Abb. 8 B).

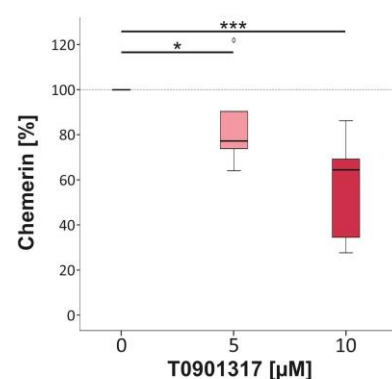
Auch bei der hepatischen Sternzelllinie LX-2 wurde bei Stimulation mit 10 μM T0901317 eine sehr signifikante Reduktion der Chemerin-Expression auf Proteinebene beobachtet ($1,3 \pm 0,4$ zu $0,6 \pm 0,2$, $p = 0,002$) (s. Abb. 8 C) [286]. Während sich die Stimulation mit 5 μM T0901317 nicht auf die sezernierte Chemerinmenge auswirkte, zeigte sich bei Inkubation von LX-2 mit 10 μM des LXR-Agonisten eine hoch signifikante Reduktion des Chemerins im Überstand (s. Abb. 8 D).

HepG2

A

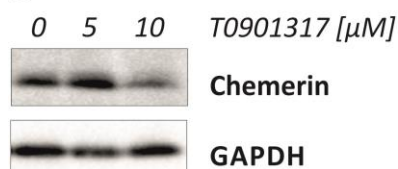


B



LX-2

C



D

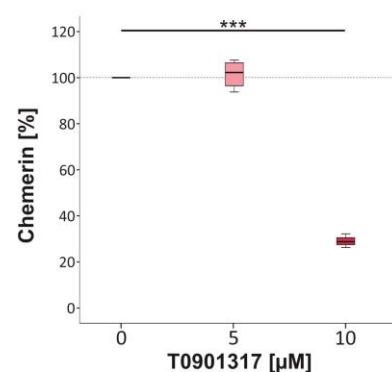


Abbildung 8 Einfluss des LXR-Agonisten T0901317 auf Chemerin in HepG2 und LX-2. (A) Chemerin-Expression in HepG2-Zellen bei Stimulation mit T0901317. Normalisierung der Genexpression auf GAPDH. **(B)** Chemerin-Protein im Überstand nach T0901317-Stimulation von HepG2. **(C)** Chemerin-Expression in LX-2-Zellen bei

Stimulation mit T0901317. Normalisierung der Genexpression auf GAPDH. **(D)** Chemerin-Protein im Überstand nach T0901317-Stimulation von LX-2. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.1.4.2 Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf Chemerin in HepG2-Zellen und LX-2-Zellen

Der *Farnesoid X receptor* (FXR) ist ein weiterer nukleärer Rezeptor, der im Darm und in der Leber stark exprimiert wird [170] und als Modulator der Lipid- und Glukosehomöostase agiert [294]. FXR wird von Gallensalzen und ungesättigten Fettsäuren aktiviert [295], wobei FXR zum Teil auch als Sensor für Gallensäuren angesehen wird, der durch Regulation des Gallensäuren-Kreislaufs die Leber vor potentiellen Schädigungen durch Überladung mit Gallensalzen schützt [296].

Um den Einfluss der Aktivierung von FXR auf die Chemerin-Expression und –Sekretion zu untersuchen, wurden HepG2- und LX-2-Zellen mit dem potenten synthetischen FXR-Agonisten GW4064 stimuliert.

Bei der Untersuchung der Expression auf Proteinebene zeigte sich kein Unterschied in der Chemerinmenge bei Stimulation von HepG2 mit 1 μM oder 2 μM GW4064 im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 9 A). Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Reduktion der sezernierten Chemerinmenge bei Stimulation mit GW4064 gemessen (s. Abb. 9 B).

Auch in LX-2-Zellen ergab die Stimulation mit GW4064 keine Änderung des zellulären Proteinlevels von Chemerin (s. Abb. 9 C). Dagegen zeigte sich hier eine sehr signifikante Erhöhung der sezernierten Chemerinmenge im Überstand (s. Abb. 9 D).

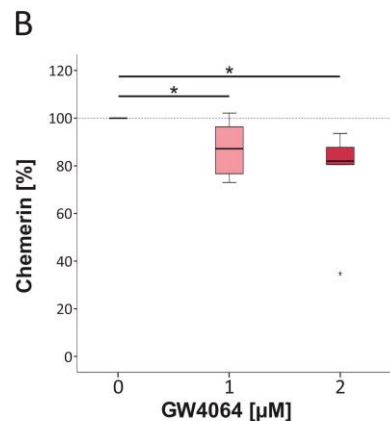
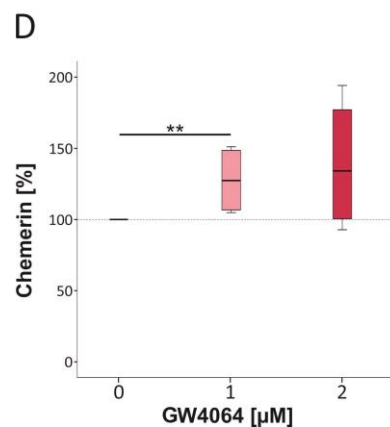
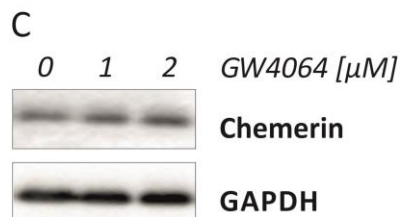
HepG2**LX-2**

Abbildung 9 Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf Chemerin in HepG2 und LX-2. (A) Chemerin-Expression in HepG2-Zellen bei Stimulation mit GW4064. Normalisierung auf GAPDH. **(B)** Chemerin-Protein im Überstand nach GW4064-Stimulation von HepG2. **(C)** Chemerin-Expression in LX-2-Zellen bei Stimulation mit GW4064. Normalisierung auf GAPDH. **(D)** Chemerin-Level im Überstand nach GW4064-Stimulation von LX-2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.1.4.3 Einfluss von Rosiglitazon auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Das Thiazolidinedion Rosiglitazon wurde als Insulin-sensibilisierendes Medikament zur Therapie bei Typ-2-Diabetes eingesetzt, da es die Empfindlichkeit der Zellen von Leber und peripherer Gewebe für Insulin steigert und somit den Blutzuckerspiegel senken kann [297, 298]. Dabei werden die Effekte von Rosiglitazon über dessen Aktivierung des nukleären Rezeptors *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) vermittelt, welcher stark im Fettgewebe exprimiert wird, und eine wichtige Rolle bei der Adipogenese und der Regulation des Lipidmetabolismus spielt [299]. PPAR γ gehört zu einer Familie von Rezeptoren, die die Expression vieler Gene, die in komplexe metabolische und pathologische Vorgänge involviert sind, regulieren [299, 300].

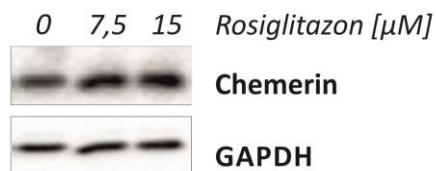
In diesem Versuch wurden HepG2- und LX-2-Zellen mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon stimuliert und die Auswirkungen auf Chemerin-Expression und -Sekretion untersucht.

Wie bei GW4064 hatte auch die Stimulation mit Rosiglitazon keinen Einfluss auf die Chemerin-Expression in HepG2 (s. Abb. 10 A). Jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der Chemerinmenge im Überstand bei Stimulation mit 15 μM Rosiglitazon (s. Abb. 10 B).

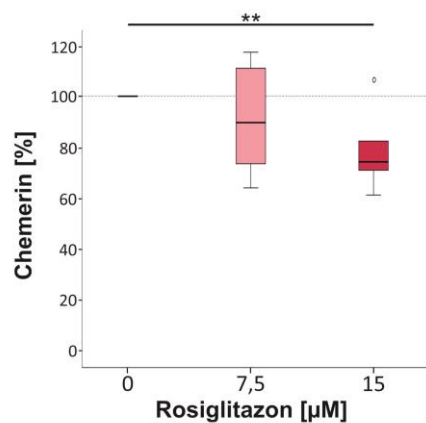
Auch in LX-2-Zellen hatte die Stimulation mit Rosiglitazon keine Auswirkung auf den zellulären Chemeringehalt (s. Abb. 10 C). Nur bei der Stimulation mit 15 μM Rosiglitazon kam es zu einem signifikanten Anstieg des Chemerin-Proteins im Überstand bei LX-2 (s. Abb. 10 D).

HepG2

A

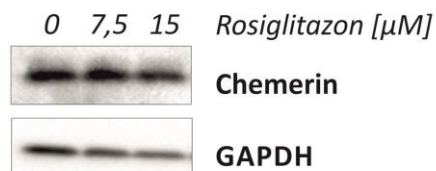


B



LX-2

C



D

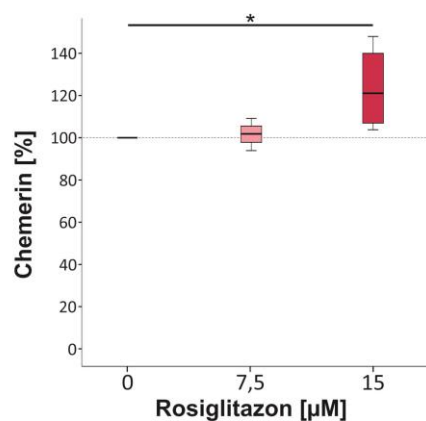


Abbildung 10 Einfluss des PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon auf Chemerin in HepG2 und LX-2. (A) Chemerin-Expression in HepG2-Zellen bei Stimulation mit Rosiglitazon. Normalisierung auf GAPDH. **(B)** Chemerin-Protein im Überstand nach Rosiglitazon-Stimulation von HepG2. **(C)** Chemerin-Expression in LX-2-Zellen bei Stimulation mit Rosiglitazon. Normalisierung auf GAPDH. **(D)** Chemerin-Protein im Überstand nach Rosiglitazon-Stimulation von LX-2. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.2 Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid haben keine positive Auswirkung auf die murine nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH)

Die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist die fortgeschrittene Form der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), und die Entzündung der verfetteten Leber ist eines der Hauptmerkmale der NASH.

Therapieoptionen beziehen sich in erster Linie auf Lebensstil-Änderungen in den Bereichen Ernährung und Bewegung [301]. Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten sind heutzutage noch limitiert, da bisher trotz etlicher klinischer Studien wenige geeignete Medikamente zur Behandlung der NASH empfohlen werden [301, 302].

Ziel dieses Versuches war es, mögliche therapeutische Optionen für die Behandlung der NASH zu erforschen, und im murinen NASH-Modell die Wirksamkeit von Resolvin E1 (RvE1) und des Chemerin-C15-Peptids (C15) auf die Resolution der Steatohepatitis untersucht.

RvE1 ist ein Derivat der Eicosapentaensäure, welches in verschiedenen Tiermodellen zur Resolution von Entzündungsprozessen beigetragen hat. Für das C15-Peptid vom Chemerin-C-Terminus wurden ebenfalls anti-inflammatorische Effekte in präklinischen Studien beschrieben. Gemeinsame Eigenschaft dieser Faktoren ist, dass beide als Ligand von CMKLR1 identifiziert wurden.

Im Rahmen dieser Studie wurden 9 Wochen alte, männliche C57BL/6-Mäuse für 12 Wochen mit der atherogenen Paigendiät gefüttert, die zu einer fortschreitenden Hepatosteatose mit Entzündung und Fibrose führt [265]. Nach 12 Wochen wurden die Mäuse an vier aufeinanderfolgenden Tagen einmal täglich i.p. mit RvE1 (1,2 ng/g Körpergewicht, 6 Mäuse), C15 (0,32 pg/g Körpergewicht, 7 Mäuse) oder PBS (Kontrolle, 8 Mäuse) gespritzt. Die in dieser Studie verwendeten Dosen an RvE1 und C15 wurden der Literatur entnommen [206, 303]. Am fünften Tag wurden die Mäuse getötet. Die Blutentnahme und Organpräparation erfolgte wie beschrieben (s. Kap. 2.2.2.1).

Die Ergebnisse dieses Versuches wurden im Februar 2015 im Artikel „*Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*“ im Journal *Experimental and Molecular Pathology* veröffentlicht [304].

3.2.1 Mäuse auf Paigendiät entwickeln eine NASH

Zur Überprüfung der NASH-Induktion wurden C57BL/6-Wildtypen für 12 Wochen mit der Paigendiät und einer entsprechenden Kontrollldiät gefüttert.

Obwohl die Paigendiät im Vergleich zur dazugehörigen Kontrollldiät die mehr als 7-fache Menge Fett enthält, unterschied sich das Körpergewicht zwischen beiden Versuchsgruppen nicht signifikant

(s. Abb. 11 A; Tabelle 12). Übereinstimmend mit der Entwicklung einer NASH beim atherogenen murinen Modell [265] hatten die Mäuse nach 12 Wochen Paigendiät ein signifikant schwereres Lebergewicht als Mäuse, die mit der Kontrolldiät gefüttert wurden (s. Abb. 11 B; Tabelle 12). Im Gegensatz dazu zeigten sich Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Fettdepots der beiden Versuchsgruppen. Nach Normalisierung auf das Körpergewicht wurde festgestellt, dass das jeweilige Gewicht des subkutanen, epididymalen und perirenen Fettdepots der Mäuse auf Paigendiät signifikant geringer ist als das der Mäuse auf Kontrolldiät (s. Abb. 11 C-E; Tabelle 12). Diese trotz des hohen Fettgehalts der Paigendiät bestehende Differenz ist in der Literatur beschrieben [265].

Bei der Messung des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts zeigte sich kein Unterschied bei Fütterung der Kontrolldiät und der Paigendiät (s. Abb. 11 F, G; Tabelle 12).

Bei der histologischen Untersuchung konnte das für die NASH typische hepatozelluläre Ballooning und die makrovesikuläre Steatose in den Lebern der Mäuse auf Paigendiät beobachtet werden (s. Abb. 11 H).

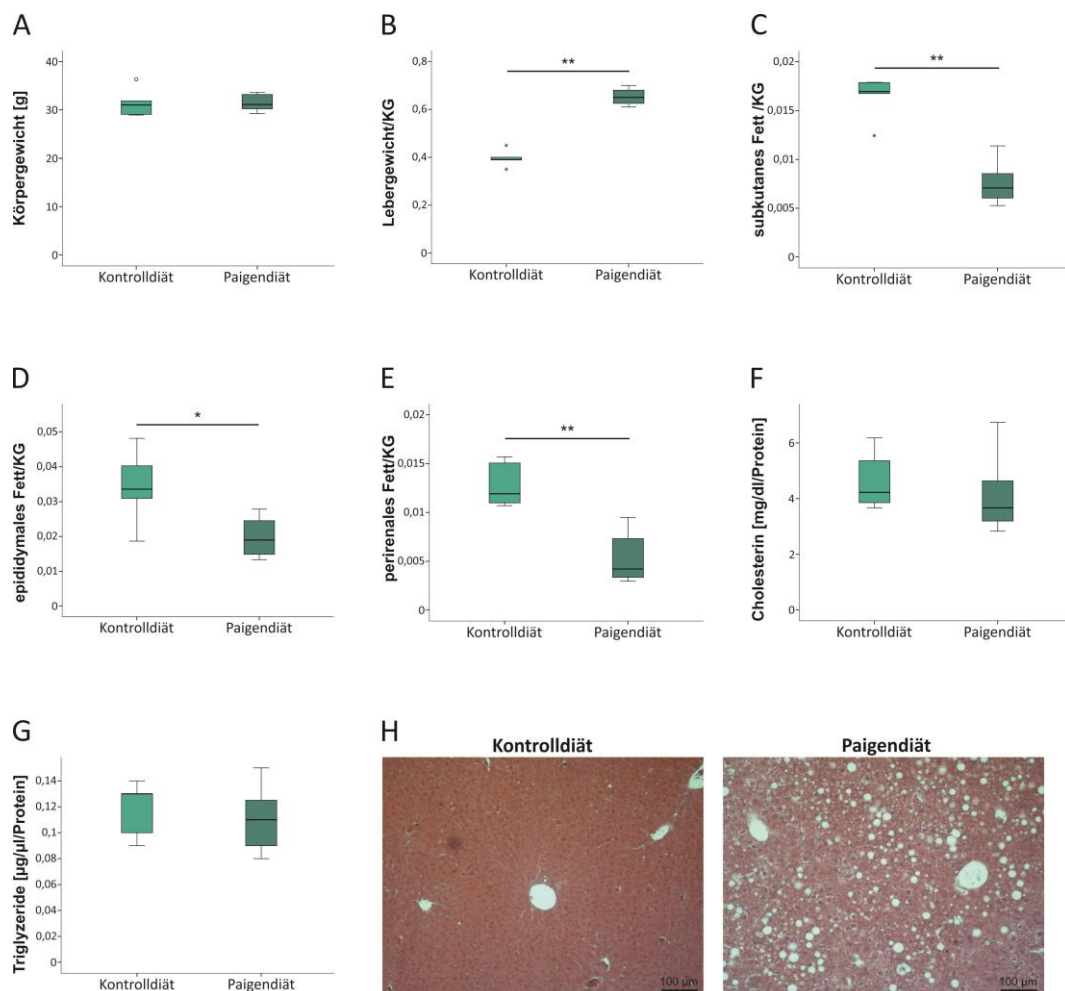


Abbildung 51 Analyse des Körpergewichts, Lebergewichts, verschiedener Fettgewebsgewichte (subkutan, epididymal, perirenal), des hepatischen Cholesterin- und Triglyzeridgehalts und der Leberhistologie bei Fütterung der atherogenen Paigendiät und der entsprechenden Kontrolldiät für 12 Wochen.

(A) Körpergewicht der Mäuse nach 12 Wochen Paigen-/Kontrolldiät. (B) Normalisiertes Lebergewicht nach 12

Wochen Paigen-/Kontrolldiät. **(C)** Normalisiertes Gewicht des subkutanen Fettgewebes nach 12 Wochen Paigen-/Kontrolldiät. **(D)** Normalisiertes Gewicht des epididymalen Fettgewebes nach 12 Wochen Paigen-/Kontrolldiät. **(E)** Normalisiertes Gewicht des perirenal Fettgewebes nach 12 Wochen Paigen-/Kontrolldiät. **(F)** Hepatischer Cholesterin-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. **(G)** Hepatischer Triglyzerid-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. **(H)** Histologischer Leberschnitt nach 12 Wochen Paigen- & Kontrolldiät, H&E-gefärbt. 10x Vergrößerung, Balken 100 µm. KG, Körpergewicht. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabelle 122 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Gewichte von Körper, Leber, dreier Fettdepots, und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzeridgehalts bei 12 Wochen Fütterung mit Paigendiät und entsprechender Kontrolldiät. KO, Kontrolldiät; Paigen, Paigendiät; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p-Wert
	KO	Paigen	KO	Paigen	KO	Paigen	
Körpergewicht [g]	31,05	31,13	31,46	31,51	± 2,99	± 1,66	n.s.
Lebergewicht/KG	0,039	0,065	0,039	0,065	± 0,004	± 0,003	0,002
subkutanes Fett/KG	0,017	0,007	0,016	0,008	± 0,002	± 0,002	0,002
epididymales Fett/KG	0,034	0,019	0,034	0,02	± 0,011	± 0,005	0,019
perirenales Fett/KG	0,012	0,004	0,013	0,005	± 0,002	± 0,002	0,002
Cholesterin [mg/dl/Protein]	4,23	3,67	4,66	4,07	± 1,07	± 1,28	n.s.
Triglyzeride [µg/µl/Protein]	0,13	0,11	0,12	0,11	± 0,022	± 0,024	n.s.

Bei der Untersuchung der hepatischen Genexpression auf mRNA-Ebene zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression der inflammatorischen Markergene F4/80 und MCP-1 bei der Paigendiät im Vergleich zur Kontrolldiät (s. Abb. 12 A, B; Tabelle 13). Auch die Expression der fibrotischen Markergene α -SMA (α -smooth muscle actin), Col1a1 und TGF β war bei Mäusen auf Paigendiät signifikant höher als bei den Kontrolltieren. (s. Abb. 12 C-E; Tabelle 13).

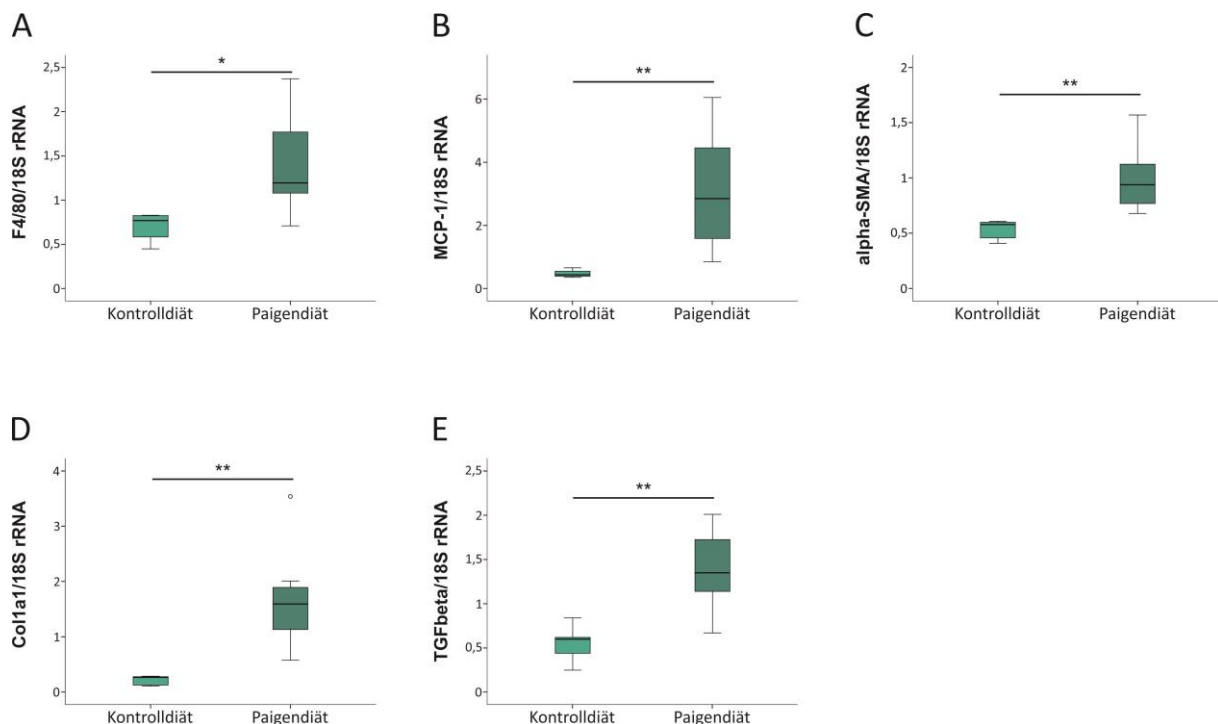


Abbildung 16 Analyse der hepatischen Genexpression inflammatorischer und fibrotischer Markergene auf mRNA-Ebene bei Paigendiät und entsprechender Kontrolldiät für 12 Wochen. **(A)** Expression des Entzündungsmarkers F4/80. **(B)** Expression des Entzündungsmarkers MCP-1. **(C)** Expression des Fibrosemarkers

α -SMA. **(D)** Expression des Fibrosemarkers Col1a1. **(E)** Expression des Fibrosemarkers TGF β . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabelle 13 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer und fibrotischer Markergene bei Paigendiät und entsprechender Kontrolldiät.

KO, Kontrolldiät; Paigen, Paigendiät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	Paigen	KO	Paigen	KO	Paigen	
<i>F4/80/18S rRNA</i>	0,77	1,19	0,71	1,39	$\pm 0,18$	$\pm 0,53$	0,028
<i>MCP-1/18S rRNA</i>	0,44	2,85	0,48	3,12	$\pm 0,13$	$\pm 2,01$	0,006
<i>α-SMA/18S rRNA</i>	0,58	0,94	0,53	0,99	$\pm 0,09$	$\pm 0,29$	0,002
<i>Col1a1/18S rRNA</i>	0,27	1,59	0,22	1,67	$\pm 0,09$	$\pm 0,89$	0,002
<i>TGFβ/18S rRNA</i>	0,60	1,35	0,55	1,39	$\pm 0,22$	$\pm 0,44$	0,003

3.2.2 Untersuchung des Einflusses von RvE1 und C15 auf Körper-, Leber-, Milz- und Fettgewebsgewichte bei Paigendiät

Die intraperitoneale Injektion von Resolvin E1, dem C15-Peptid oder PBS in Kombination mit der Paigendiät wirkte sich nicht auf das Körper- und Lebergewicht der Mäuse in den verschiedenen Versuchsgruppen aus (s. Abb. 13 A, B; Tabelle 14). Auch das Gewicht der Milz und der drei Fettgewebsarten subkutan, epididymal und perirenal unterschied sich nicht zwischen den Tieren der unterschiedlichen Gruppen (s. Abb. 13 C-F; Tabelle 14).

Bei der histologischen Untersuchung H&E-gefärbter Leberschnitte war das für die Paigendiät typische hepatozelluläre Ballooning und die makrovesikuläre Steatose zu sehen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Leberhistologie zwischen PBS-, RvE1- oder C15-Injektion (s. Abb. 13 G).

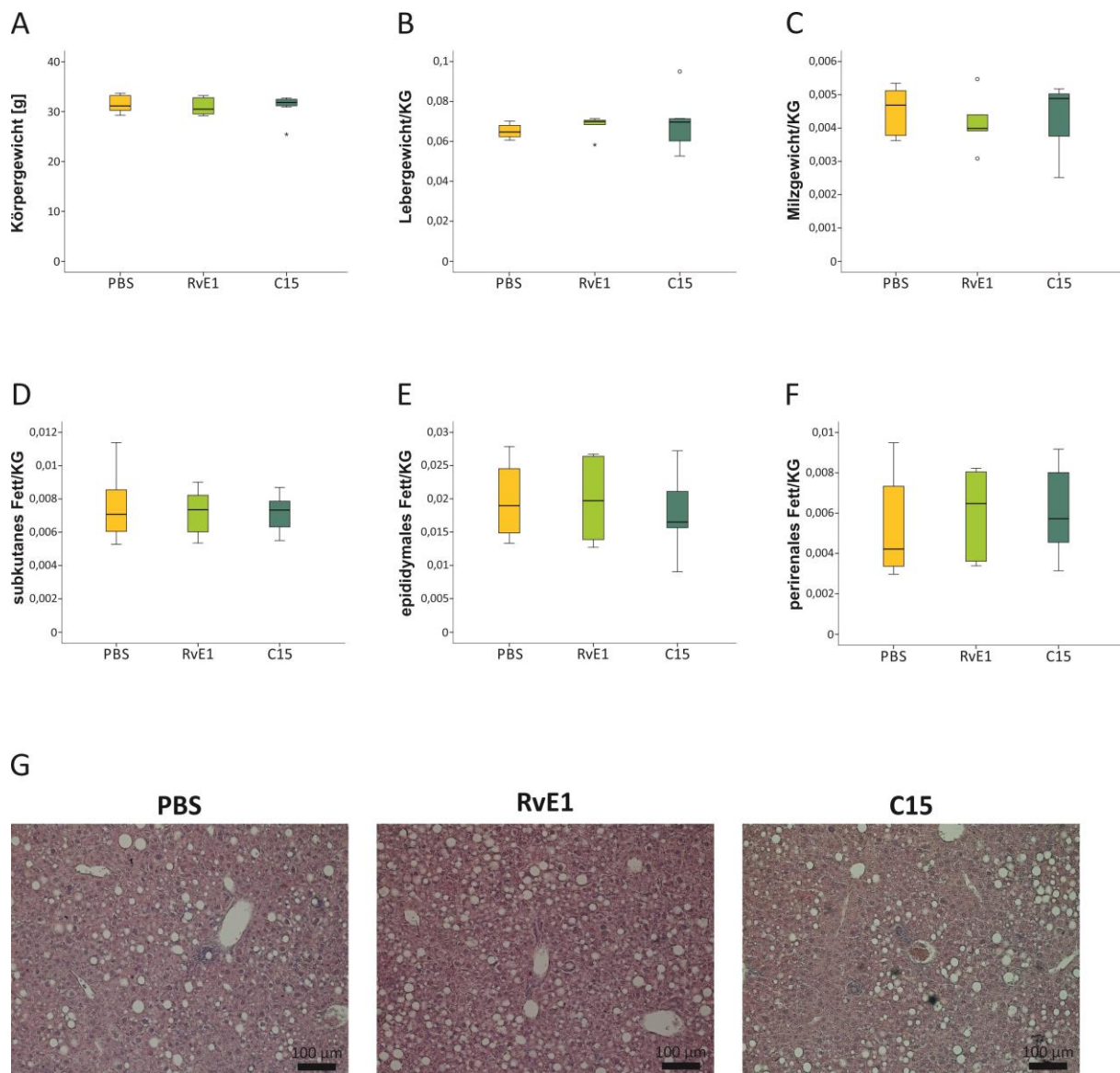


Abbildung 17 Analyse des Körpergewichts, Lebergewichts, Milzgewichts, verschiedener Fettgewebse Gewichte (subkutan, epididymal, perirenal) und der Leberhistologie bei RvE1-, C15- oder PBS-Intervention. **(A)** Körpergewicht der RvE1-, C15- und PBS-injizierten C57BL/6-Mäuse auf Paigendiät. **(B)** Normalisiertes Lebergewicht. **(C)** Normalisiertes Milzgewicht. **(D)** Normalisiertes Gewicht des subkutanen Fettgewebes. **(E)** Normalisiertes Gewicht des epididymalen Fettgewebes. **(F)** Normalisiertes Gewicht des perirenenalen Fettgewebes. **(G)** Histologischer Leberschnitt, H&E-gefärbt. 10x Vergrößerung, Balken 100 µm. KG, Körpergewicht.

Tabelle 14 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Gewichte von Körper, Leber, Milz und dreier Fettdepots bei Intervention mit PBS, RvE1 oder C15. KG, Körpergewicht; n.s., nicht signifikant.

	Median			Mittelwert			Standardabweichung			p - Wert
	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	
Körpergewicht [g]	31,13	30,49	31,8	31,51	30,95	31,04	± 1,66	± 1,71	± 2,55	n.s.
Lebergewicht/KG	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	± 0,003	± 0,005	± 0,014	n.s.
Milzgewicht/KG	0,005	0,004	0,005	0,005	0,004	0,004	± 0,0007	± 0,0008	± 0,001	n.s.
subkutanes Fett/KG	0,007	0,007	0,007	0,008	0,007	0,007	± ±0,002	± 0,0014	± 0,001	n.s.
epididymales Fett/KG	0,019	0,02	0,017	0,02	0,02	0,02	± 0,005	± 0,006	± 0,006	n.s.
perirenales Fett/KG	0,004	0,007	0,006	0,005	0,006	0,006	± 0,002	± 0,002	± 0,002	n.s.

3.2.3 Einfluss von RvE1 und C15 auf verschiedene Serum- und Leberparameter

Bei ob/ob-Mäusen führt die Behandlung mit ω -3-PUFAs, den Vorläufern der Resolvinen, zur Induktion der mRNA-Expression von Adiponectin im weißen Fettgewebe [303].

In dieser Studie aber zeigte sich kein Unterschied zwischen der Menge des hepatoprotektiven Adipokins [305] im Serum bei Behandlung mit RvE1 oder C15 im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 14 A; Tabelle 15).

Der Wert der Alanin-Aminotransferase (ALT), der bei Schädigung von Hepatozyten im Serum erhöht ist, war im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe durch die Behandlung mit RvE1 oder C15 nicht erniedrigt (s. Abb. 14 B; Tabelle 15).

Eine signifikante Reduktion des Insulinspiegels im Serum zeigte sich zwischen den mit RvE1-behandelten Mäusen und der C15-Gruppe. Im Vergleich zu den mit PBS-behandelten Kontrollmäusen war der Insulinspiegel der RvE1- bzw. C15-Mäuse nicht signifikant verändert (s. Abb. 14 C; Tabelle 15).

Beim Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalt der Leber konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen beobachtet werden (s. Abb. 14 D, E; Tabelle 15).

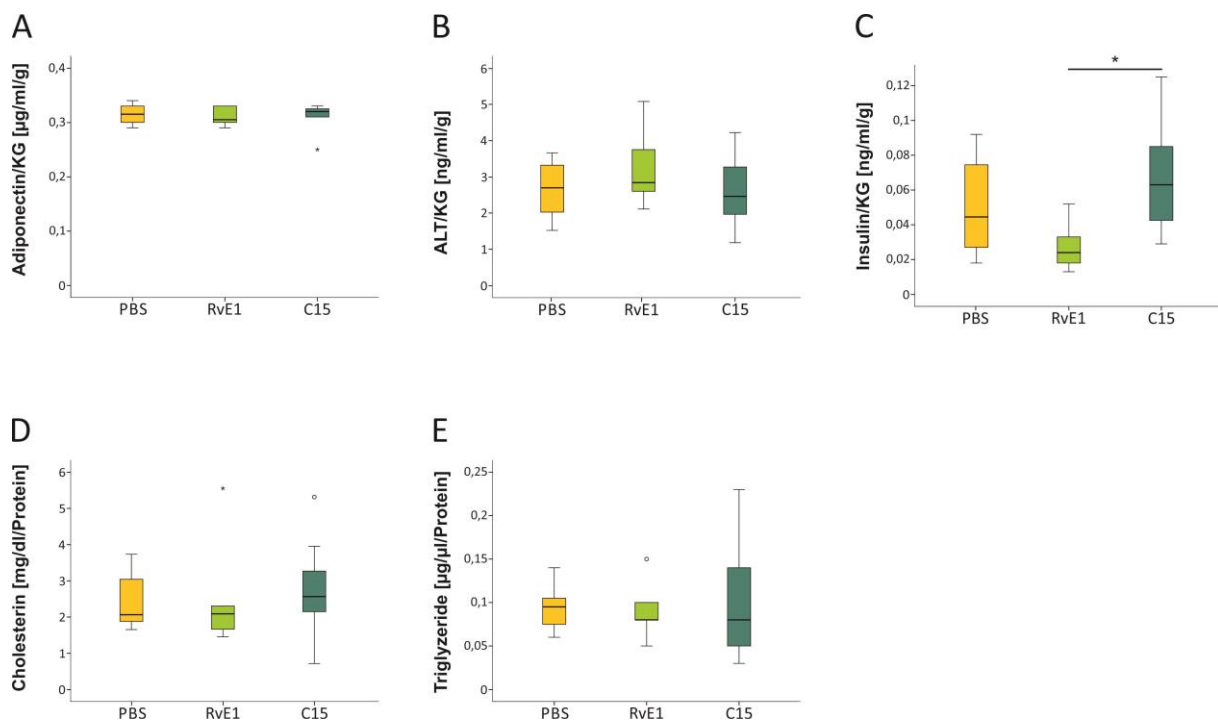


Abbildung 18 Analyse der Serumspiegel von Adiponectin, der Alaninaminotransferase und Insulin und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts bei RvE1-, C15- oder PBS-Intervention. (A) Serumspiegel von Adiponectin, auf das Körpergewicht normalisiert. **(B)** Serumspiegel der Alaninaminotransferase, auf das Körpergewicht normalisiert. **(C)** Serumspiegel von Insulin, auf das Körpergewicht normalisiert. **(D)** Hepatischer Cholesterin-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. **(E)** Hepatischer Triglyzerid-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. KG, Körpergewicht; ALT, Alanin-Aminotransferase. * $p < 0,05$.

Tabelle 15 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte des Serumspiegels von Adiponectin, ALT und Insulin, und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts bei RvE1-, C15- oder PBS-Intervention. KG, Körpergewicht; n.s., nicht signifikant.

	Median			Mittelwert			Standardabweichung			p - Wert
	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	
Adiponectin/KG [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{g}$]	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	$\pm 0,002$	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$	n.s.
ALT/KG [$\text{ng}/\text{ml}/\text{g}$]	2,69	2,84	2,46	2,66	3,2	2,62	$\pm 0,81$	$\pm 1,06$	$\pm 1,09$	n.s.
Insulin/KG [$\text{ng}/\text{ml}/\text{g}$]	0,04	0,02	0,06	0,05	0,03	0,07	$\pm 0,03$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	0,014 [#]
Cholesterin [$\text{mg}/\text{dl}/\text{Protein}$]	2,07	2,09	2,57	2,43	2,53	2,78	$\pm 0,83$	$\pm 1,52$	$\pm 1,47$	n.s.
Triglyzeride [$\mu\text{g}/\mu\text{l}/\text{Protein}$]	0,09	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,07$	n.s.
# zwischen RvE1 und C15										

3.2.4 Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression inflammatorischer Markergene

Um die Auswirkungen von RvE1 und C15 auf die Diät-induzierte Entzündung in der Leber zu untersuchen, wurde die hepatische mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker mittels rt-PCR analysiert. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der hepatischen Expression von F4/80, MCP-1 und TNF α in den Behandlungsgruppen (s. Abb. 15 A-C; Tabelle 16).

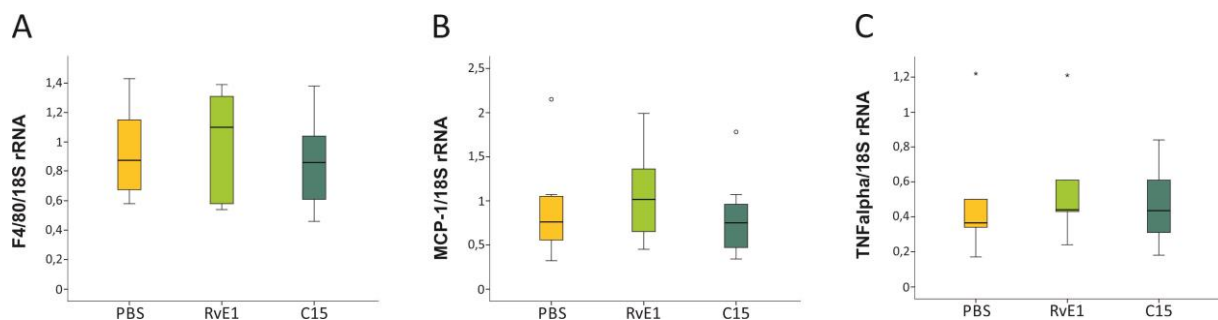


Abbildung 19 Analyse der hepatischen Genexpression inflammatorischer Markergene auf mRNA-Ebene bei Intervention mit PBS, RvE1 oder C15. (A) Expression des Entzündungsmarkers F4/80. (B) Expression des Entzündungsmarkers MCP-1. (C) Expression des Entzündungsmarkers TNF α . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA.

Tabelle 16 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer Markergene bei Intervention mit PBS, RvE1 oder C15. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. n.s., nicht signifikant.

	Median			Mittelwert			Standardabweichung			p - Wert
	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	
F4/80/18S rRNA	0,88	1,10	0,86	0,93	1,00	0,86	$\pm 0,30$	$\pm 0,39$	$\pm 0,33$	n.s.
MCP-1/18S rRNA	0,76	1,02	0,82	0,92	1,08	0,82	$\pm 0,61$	$\pm 0,55$	$\pm 0,49$	n.s.
TNF α /18S rRNA	0,37	0,44	0,44	0,49	0,59	0,47	$\pm 0,37$	$\pm 0,37$	$\pm 0,23$	n.s.

3.2.5 Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression fibrotischer Markergene

Durch die atherogene Paigendiät werden auch fibrotische Vorgänge in der Leber induziert, was vor allem auf den hohen Cholat-Gehalt der Diät zurückzuführen ist [266]. Zudem scheint auch die

Hochfett-Komponente der Diät zur Aktivierung der hepatischen Sternzellen führen [265], die die hauptsächliche Quelle fibrotischer Proteine wie Kollagen sind [306].

Bei der Untersuchung der hepatischen Expression der fibrotischen Markergene α -SMA, Col1a1, CTGF (*connective tissue growth factor*) und TGF β zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (s. Abb. 16 A-D, Tabelle 17).

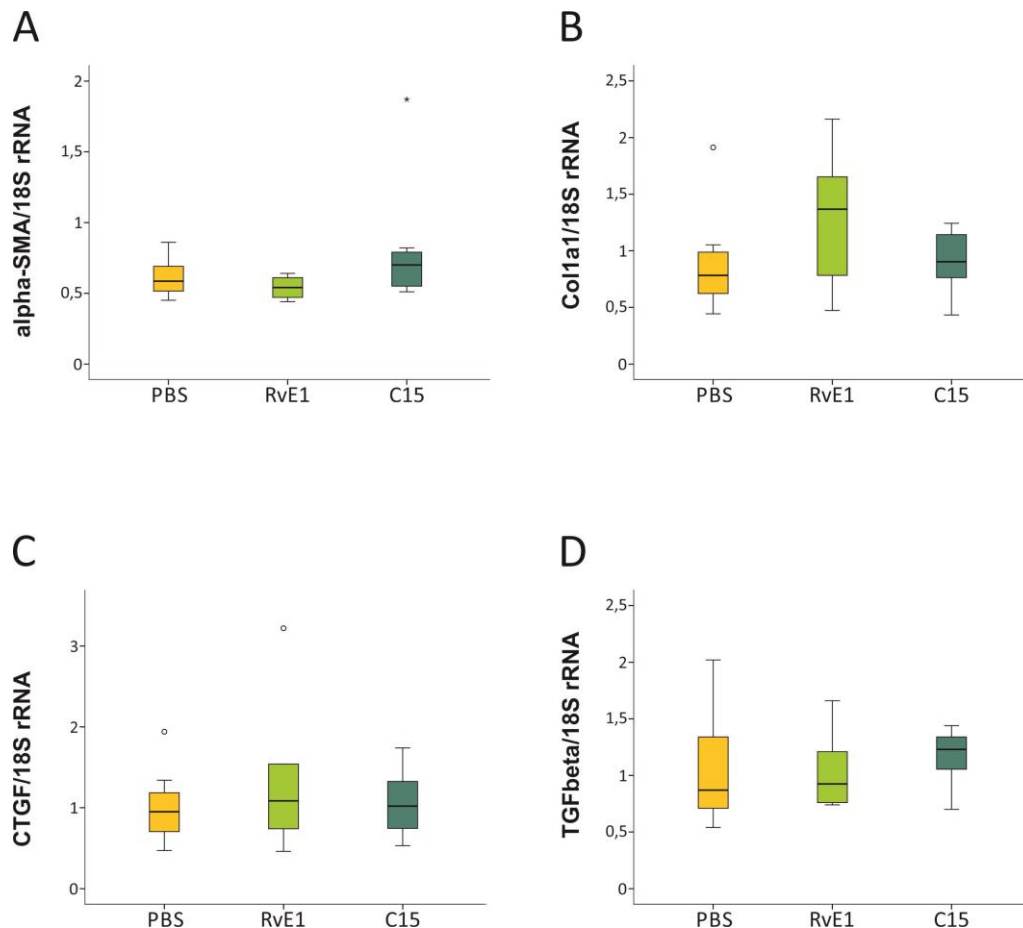


Abbildung 110 Analyse der hepatischen Genexpression fibrotischer Markergene auf mRNA-Ebene bei Intervention mit PBS, RvE1 oder C15. **(A)** Expression des Fibrosemarkers α -SMA. **(B)** Expression des Fibrosemarkers Col1a1. **(C)** Expression des Fibrosemarkers CTGF. **(D)** Expression des Fibrosemarkers TGF β . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA.

Tabelle 17 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression fibrotischer Markergene bei Intervention mit PBS, RvE1 oder C15. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. n.s., nicht signifikant.

	Median			Mittelwert			Standardabweichung			p - Wert
	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	PBS	RvE1	C15	
α -SMA/18S rRNA	0,59	0,54	0,70	0,61	0,54	0,82	$\pm 0,13$	$\pm 0,08$	$\pm 0,48$	n.s.
Col1a1/18S rRNA	0,78	1,37	0,90	0,89	1,29	0,89	$\pm 0,46$	$\pm 0,60$	$\pm 0,32$	n.s.
CTGF/18S rRNA	0,95	1,09	1,02	1,02	1,36	1,06	$\pm 0,49$	$\pm 0,98$	$\pm 0,45$	n.s.
TGF β /18S rRNA	0,87	0,93	1,23	1,05	1,04	1,17	$\pm 0,52$	$\pm 0,35$	$\pm 0,27$	n.s.

3.2.6 Einfluss von RvE1 und C15 auf die hepatische Expression von Chemerin und CMKLR1

Im Vergleich zur gesunden Leber wird im murinen NASH-Modell die hepatische Expression von Chemerin induziert [200].

Die Behandlung mit RvE1 und C15 hatte im Vergleich zur PBS-Kontrolle keine Auswirkung auf die mRNA-Expression von Chemerin in der Leber (s. Abb. 17 A).

Auch die Expression des gemeinsamen Rezeptors von RvE1 und C15, CMKLR1, war bei allen Gruppen vergleichbar (s. Abb. 17 B). Bei der Untersuchung der hepatischen Chemerin-Expression auf Proteinebene zeigte sich beim Vergleich der PBS-Kontrolle mit der C15-Gruppe eine signifikante Reduktion von Chemerin in den Lebern der C15-Mäuse (s. Abb. 17 C, D).

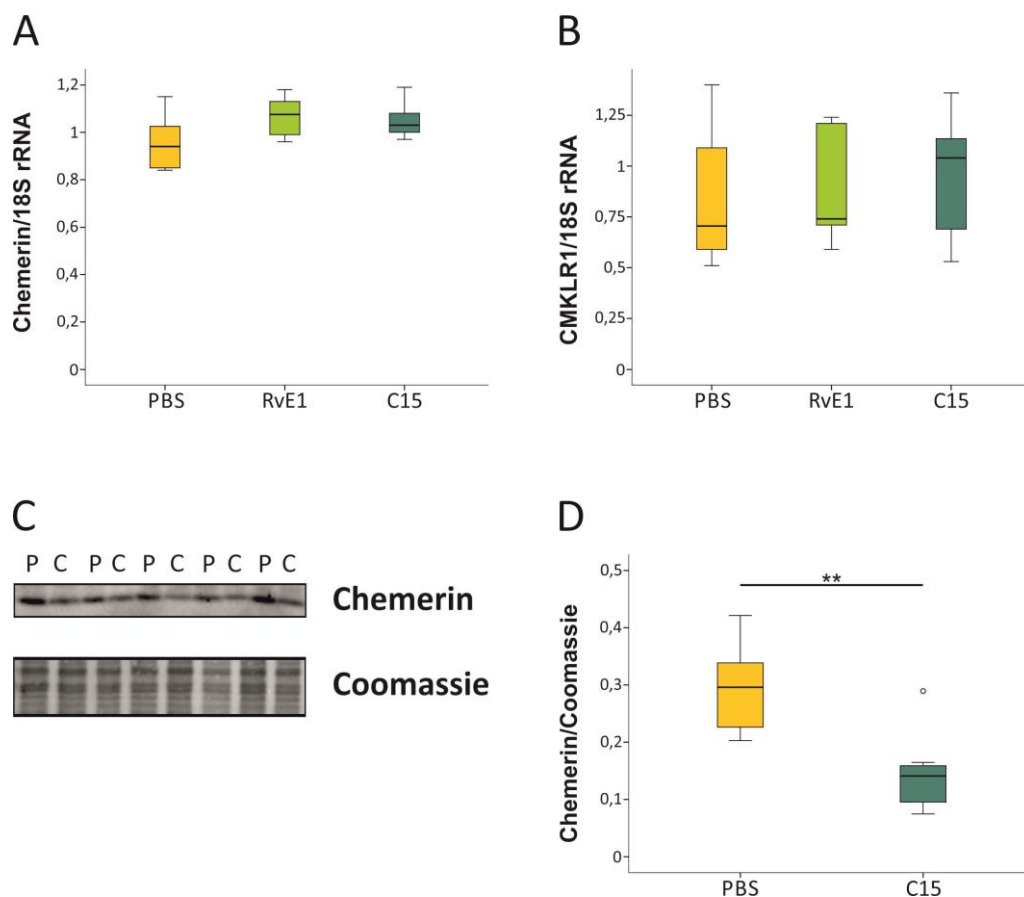


Abbildung 111 Analyse der Chemerin- und CMKLR1-Expression bei Intervention mit PBS, RvE1 und C15.

(A) Expression von Chemerin, auf 18S rRNA normalisiert. **(B)** Expression von CMKLR1, auf 18S rRNA normalisiert. **(C)** Western Blot-Analyse der hepatischen Expression von Chemerin auf Proteinebene bei Intervention mit PBS [P] und C15-Peptid [C] nach 12 Wochen Paigendiät. Coomassie-Färbung der Western Blot-Membran als Beladungskontrolle. **(D)** Quantifizierung der hepatischen Chemerin-Proteinexpression aus (C) bei Intervention mit PBS oder C15, auf Coomassie-Beladungskontrolle normalisiert. ** $p < 0,01$.

3.2.7 Assoziation von hepatischer Chemerin- und CMKLR1-Expression mit NASH-Parametern bei Behandlung mit RvE1 und C15

Da Chemerin und CMKLR1 in der NASH konträr reguliert werden [186, 200], wurden mögliche Assoziationen der Expression beider Gene mit den gemessenen Parametern untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Chemerin- und CMKLR1-Expression weder mit dem Körper- noch mit dem Lebergewicht assoziiert war. Weiterhin gab es auch bei Chemerin keinen Zusammenhang mit der hepatischen Expression der untersuchten inflammatorischen und fibrotischen Markergene.

Im Gegensatz dazu zeigten sich teilweise hoch signifikante positive Korrelationen der hepatischen CMKLR1-Expression mit der Expression der inflammatorischen und fibrotischen Markergene F4/80, MCP-1, TNF α , α -SMA, Col1a1 und TGF β (s. Abb. 18; Tabelle 18).

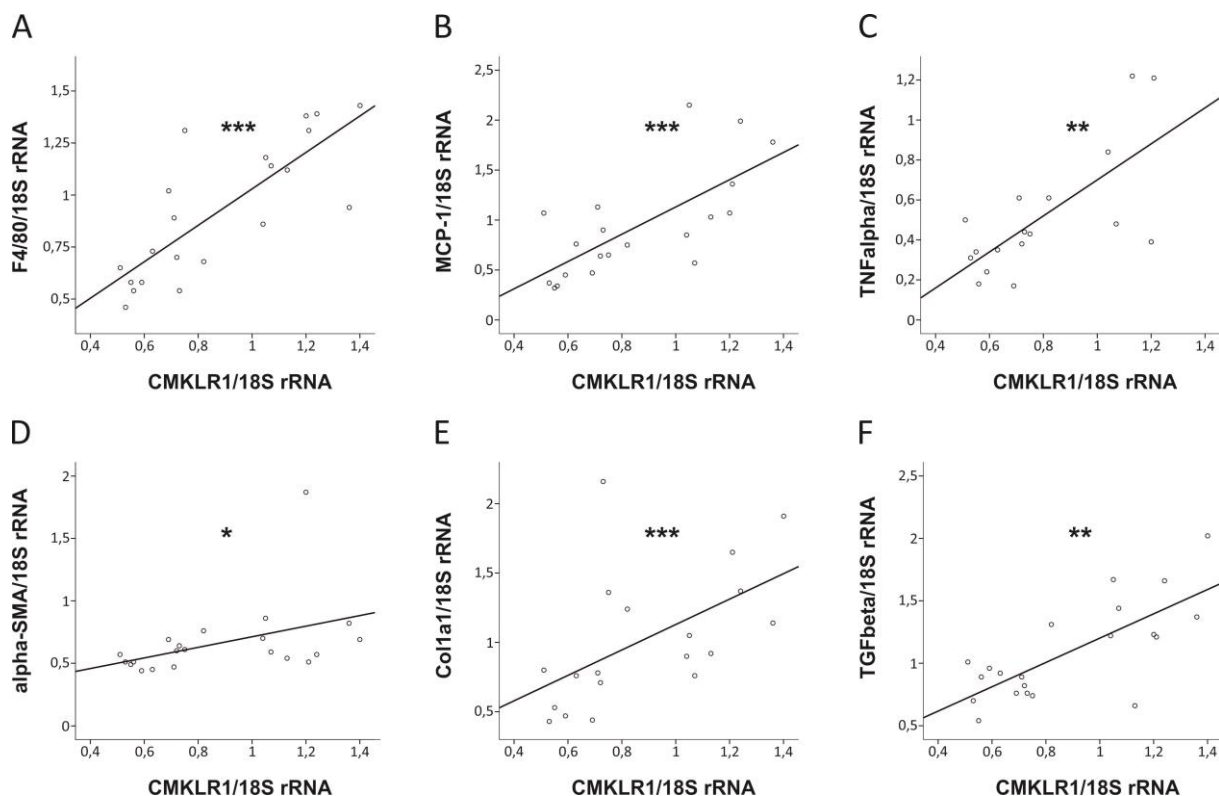


Abbildung 112 Korrelation der hepatischen mRNA-Expression von CMKLR1 mit der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer und fibrotischer Markergene nach 12 Wochen Paigendiät. (A) Korrelation von CMKLR1 mit F4/80. (B) Korrelation von CMKLR1 mit MCP-1. (C) Korrelation von CMKLR1 mit TNF α . (D) Korrelation von CMKLR1 mit α -SMA. (E) Korrelation von CMKLR1 mit Col1a1. (F) Korrelation von CMKLR1 mit TGF β . Für die Berechnung der Korrelationen wurden die Daten aller drei Versuchsgruppen verwendet. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 18 Korrelationskoeffizienten und p-Werte der Spearman-Korrelation der hepatischen mRNA-Expression von CMLKR1 mit der hepatischen mRNA-Expression verschiedener inflammatorischer und fibrotischer Markergene nach 12 Wochen Paigendiät. Für die Berechnung der Korrelationen wurden die Daten aller drei Versuchsgruppen verwendet. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA.

	Korrelationskoeffizient ρ	p-Wert
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow <i>F4/80</i>	0,808	0,001
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow <i>MCP-1</i>	0,666	0,001
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow <i>TNFα</i>	0,638	0,006
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow α -SMA	0,544	0,011
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow <i>Col1a1</i>	0,706	0,001
<i>CMLKR1</i> \leftrightarrow <i>TGFβ</i>	0,630	0,002

3.3 Hepatische Überexpression von Chemerin im murinen NASH-Modell

Das Chemokin Chemerin wird hauptsächlich in Hepatozyten und Adipozyten exprimiert und in den extrazellulären Raum sezerniert [200].

Um den Einfluss von hepatischem Chemerin auf das Krankheitsgeschehen in der NAFLD näher zu untersuchen, wurde im Rahmen dieses Versuchs endogenes Chemerin in der Form des Proproteins Chemerin162 und einer prozessierten Chemerin-Isoform, Chemerin156, in der Leber von C57BL/6-Mäusen überexprimiert. Anschließend wurde durch die Fütterung einer Methionin- und Cholin-defizienten Diät (MCD-Diät) eine NASH induziert und die Tiere wie beschrieben präpariert (s. Kap. 2.2.2.1). Die Fettdepots waren aufgrund des geringen Körpergewichts der Tiere und der Fettretention in der Leber bei MCD-Diät sehr klein und wurden aufgrund zu hoher Messungenauigkeit nicht einzeln gewogen.

3.3.1 Mäuse auf MCD-Diät entwickeln eine NASH

Zur Überprüfung der NASH-Induktion wurden C57BL/6-Wildtypen für 2 Wochen mit der Paigendiät und einer entsprechenden Kontrolldiät gefüttert.

Das Fehlen von Methionin und Cholin in der Diät führt zur Akkumulation von Lipiden in der Leber und Schädigung der Hepatozyten aufgrund des Mangels an anti-oxidativ wirkenden Enzymen. Zudem kommt es wegen des fehlenden Lipid-Abtransports aus der Leber in den Körper zum massiven Gewichtsverlust [262].

Übereinstimmend damit wogen Mäuse auf Kontrolldiät nach 2 Wochen Fütterung im Mittel etwa 8 Gramm mehr als Mäuse auf MCD-Diät (s. Abb. 19 A; Tabelle 19) und hatten ein tendenziell geringeres Lebergewicht, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (s. Abb. 19 B; Tabelle 19).

Der Triglyzerid-Gehalt der Leber war bei den MCD-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle erwartungsgemäß signifikant höher (s. Abb. 19 C; Tabelle 19). Auch der Serumspiegel des hepatoprotektiven Adipokins Adiponectin im Serum war nach MCD-Diät signifikant erhöht (s. Abb. 19 D; Tabelle 19).

Bei der histologischen Untersuchung konnten das mit der NASH einhergehende hepatozelluläre Ballooning und die makrovesikuläre Steatose in den H&E-gefärbten Leberschnitten der MCD-Mäuse deutlich beobachtet werden (s. Abb. 19 E).

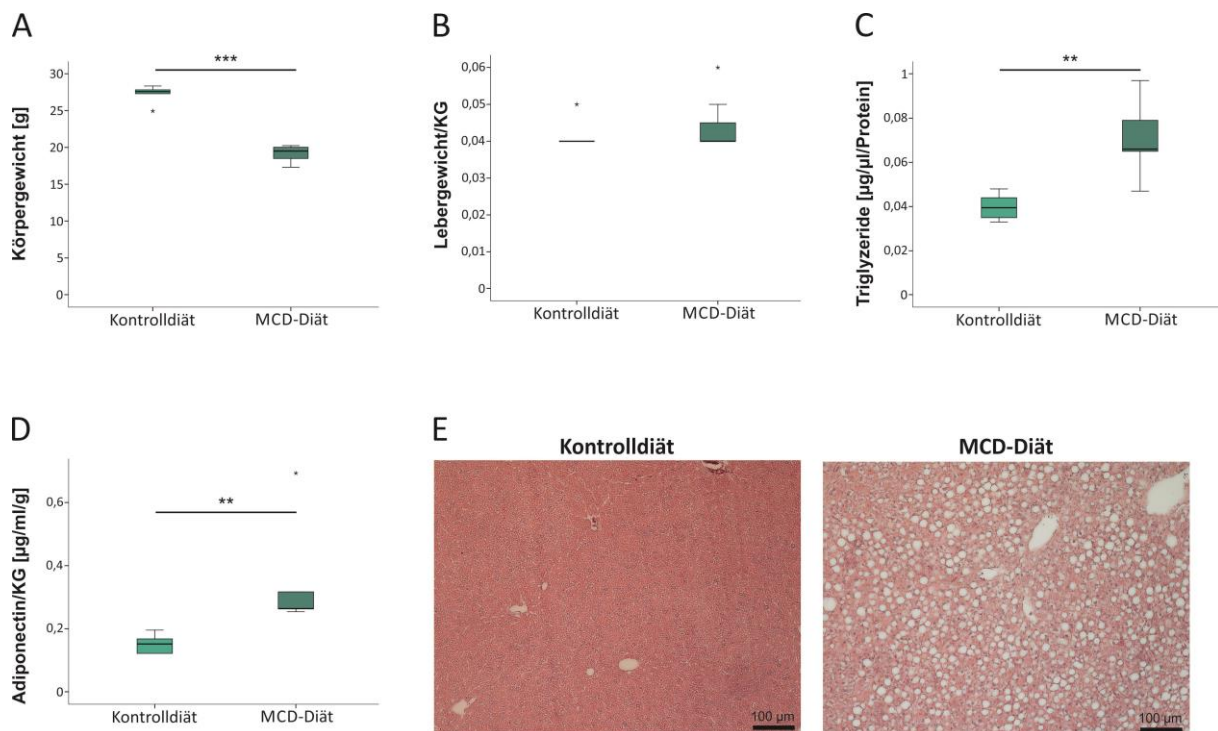


Abbildung 113 Analyse des Körpergewichts, Lebergewichts, des hepatischen Triglyzerid-Gehalts, des systemischen Adiponectin-Spiegels und der Leberhistologie bei Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät und entsprechender Kontrolldiät. **(A)** Körpergewicht von Mäusen nach 2 Wochen MCD-/Kontrolldiät. **(B)** Normalisiertes Lebergewicht nach 2 Wochen MCD-/Kontrolldiät. **(C)** Hepatischer Triglyzerid-Gehalt nach 2 Wochen MCD-/Kontrolldiät, auf die Proteinmenge normalisiert. **(D)** Serumspiegel von Adiponectin, auf das Körpergewicht normalisiert. **(F)** Histologischer Leberschnitt nach 2 Wochen MCD-/Kontrolldiät, H&E-gefärbt. 10x Vergrößerung, Balken 100 µm. KG, Körpergewicht; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 19 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Gewichte von Körper, Leber, des hepatischen Triglyzerid-Gehalt und des systemischen Adiponectin-Spiegels nach 2 Wochen MCD- und Kontrolldiät. KO, Kontrolldiät; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	MCD	KO	MCD	KO	MCD	
Körpergewicht [g]	27,59	19,51	27,26	19,21	± 0,16	± 1,04	0,001
Lebergewicht/KG	0,04	0,04	0,04	0,04	± 0,004	± 0,007	n.s.
Triglyzeride [µg/µl/Protein]	0,04	0,07	0,04	0,07	± 0,006	± 0,02	0,009
Adiponectin/KG [µg/ml/g]	0,15	0,26	0,15	0,36	± 0,03	± 0,19	0,004

Die einsetzende Entzündung und Fibrose bei dieser Diät-induzierten NASH wurde durch rt-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der hepatischen Expression der inflammatorischen Markergene F4/80 und MCP-1 bei Mäusen auf MCD-Diät im Vergleich zu Mäusen auf Kontrolldiät (s. Abb. 20 A, B; Tabelle 20). Auch die Expression des fibrotischen Markergens TGF β war signifikant erhöht (s. Abb. 20 C; Tabelle 20).

Bei der Untersuchung von Chemerin und CMKLR1 in beiden Gruppen wurde bei beiden Genen eine signifikant höhere Expression in der MCD-Leber gemessen (s. Abb. 20 D, E; Tabelle 20).

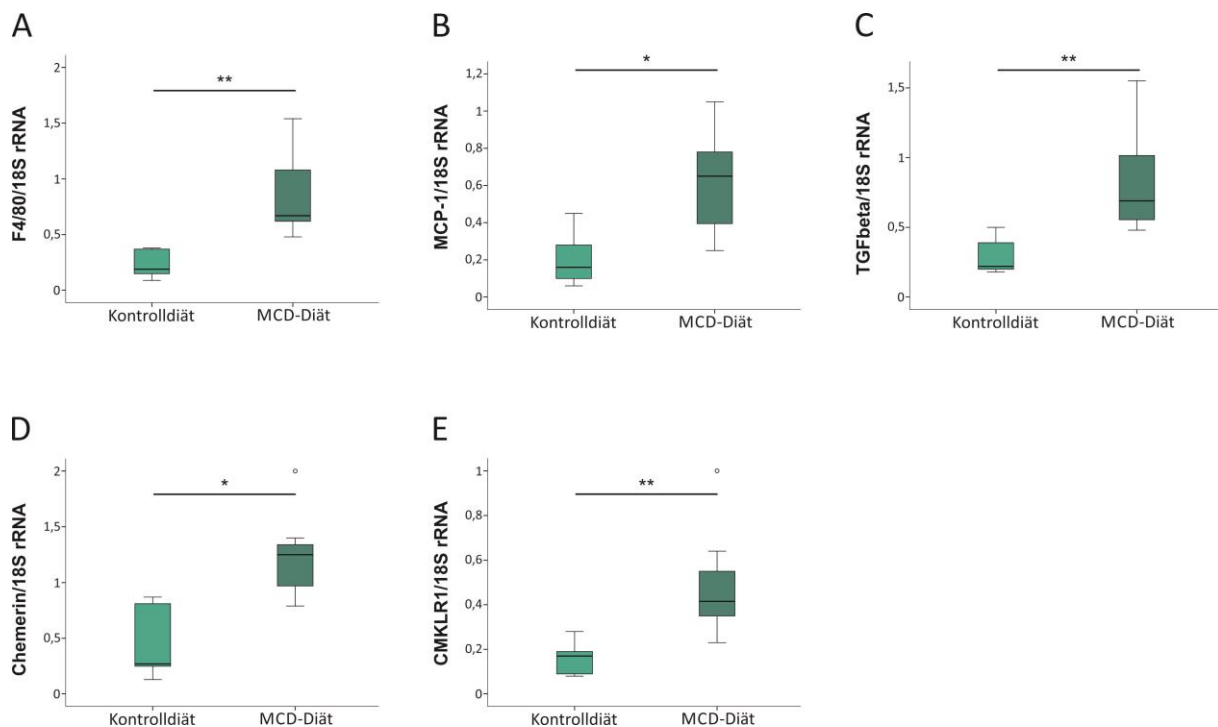


Abbildung 14 Analyse der hepatischen Genexpression inflammatorischer und fibrotischer Markergene, des Chemokins Chemerin und seines Rezeptors CMKLR1 auf mRNA-Ebene nach 2 Wochen MCD-Diät oder entsprechender Kontrolldiät. (A) Expression des Entzündungsmarkers F4/80. (B) Expression des Entzündungsmarkers MCP-1. (C) Expression des Fibrosemarkers TGFβ. (D) Expression von Chemerin. (E) Expression von CMKLR1. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. *p < 0,05, ** p < 0,01.

Tabelle 20 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer und fibrotischer Markergene, und Chemerin und CMKLR1 nach 2 Wochen MCD-Diät oder Kontrolldiät. KO, Kontrolldiät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	MCD	KO	MCD	KO	MCD	
<i>F4/80/18S rRNA</i>	0,19	0,67	0,24	0,87	± 0,13	± 0,42	0,003
<i>MCP-1/18S rRNA</i>	0,16	0,65	0,21	0,61	± 0,16	± 0,29	0,03
<i>TGFβ/18S rRNA</i>	0,22	0,69	0,29	0,82	± 0,14	± 0,37	0,003
<i>Chemerin/18S rRNA</i>	0,27	1,25	0,47	1,24	± 0,35	± 0,37	0,011
<i>CMKLR1/18S rRNA</i>	0,17	0,42	0,16	0,48	± 0,08	± 0,24	0,003

3.3.2 AAV-vermittelte hepatische Chemerin162-Überexpression im murinen NASH-Modell

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von Chemerin in der NAFLD sollte die Chemerin-Isoform Chemerin162 in Mäusen hepatisch überexprimiert werden. Durch Fütterung einer Methionin- und Cholin-defizienten Diät (MCD-Diät) wurde eine murine NASH induziert.

Die spezifisch hepatische Überexpression wurde durch Adeno-assoziierte Viren (AAV) vermittelt, die die zu überexprimierende Sequenz mit vorangestelltem Leber-spezifischem Promotor ins Wirtsgenom übertragen (s. Abschnitt 2.2.2.3).

Den C57BL/6-Mäuse wurde i.p. 1×10^{11} AAVs injiziert, die die Sequenz des Proproteins Chemerin162 auf ihrem Expressionsplasmid tragen und in das Wirtsgenom integrieren. Als Kontrolle wurden Mäuse mit AAVs infiziert, die keine kodierende Sequenz auf ihrem Expressionsplasmid tragen. Danach wurde die MCD-Diät für zwei Wochen gefüttert und die Tiere anschließend wie beschrieben präpariert (s. Abschnitt 2.2.2.1).

3.3.2.1 Analyse der hepatischen Chemerin162-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene

Auf mRNA-Ebene war die hepatische Chemerin-Expression bei Tieren der Überexpressions-Gruppe im Mittel doppelt so hoch wie bei den Kontrolltieren (s. Abb. 21 A, Tabelle 21). Dieser Unterschied in der Expression des Chemokins war hoch signifikant.

Die hepatische Expression von Chemerin auf Proteinebene war bei der Überexpression im Vergleich zu den Kontroll-Tieren generell etwa um das etwa 1,7-fache erhöht, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (s. Abb. 21 B, C, Tabelle 21).

Die Analyse der hepatischen mRNA-Expression des Chemerin-Rezeptors CMKLR1 ergab eine tendenzielle, aber nicht signifikante Reduktion der Expression um das etwa 1,6-fache bei Chemerin-Überexpression (s. Abb. 21 D; Tabelle 21).

Zudem wurde mittels ELISA untersucht, ob die Chemerin162-Überexpression Auswirkungen auf die Menge des systemischen Chemerin-Spiegels hat. Dabei zeigte sich bei Überexpression eine signifikante Erhöhung der systemischen Chemerinmenge um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 21 E; Tabelle 21).

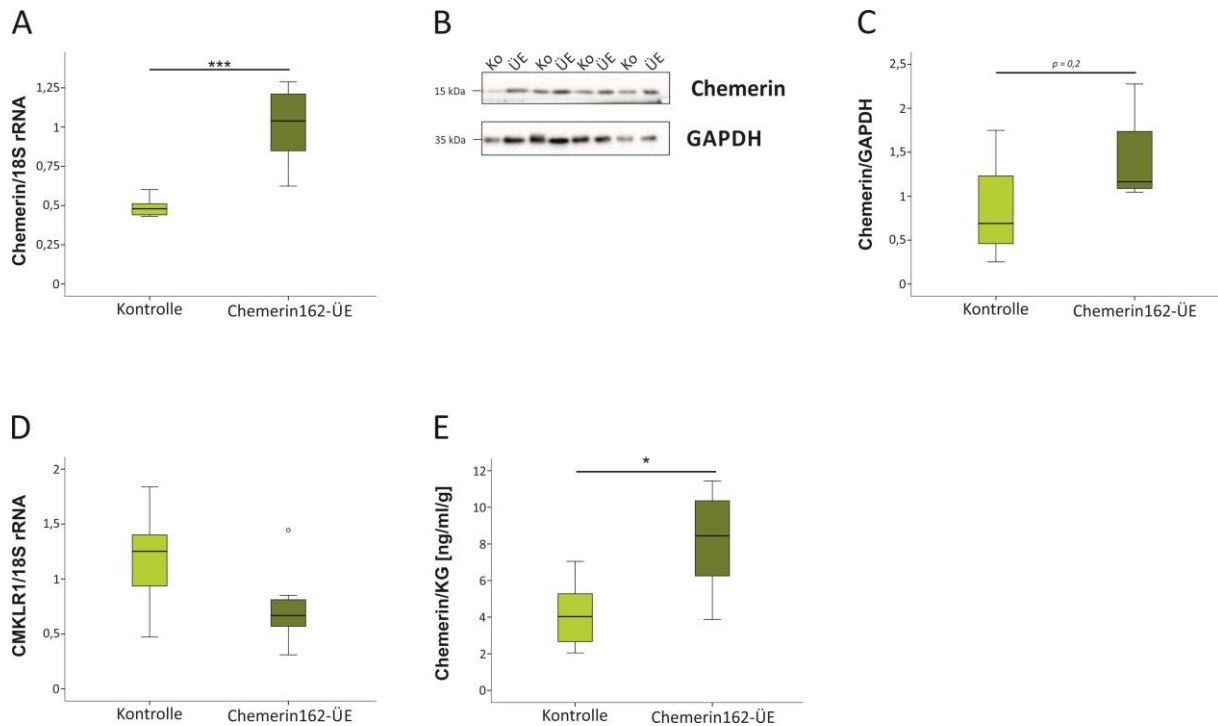


Abbildung 15 Analyse der hepatischen Chemerin- und CMKLR1-Expression und des systemischen Chemerin-Spiegels bei Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. (A) Hepatische Chemerin-mRNA-Expression, auf 18S rRNA normalisiert. **(B)** Western Blot-Analyse der hepatischen Expression von Chemerin und GAPDH auf Proteinebene. **(C)** Quantifizierung der hepatischen Chemerin-Proteinexpression aus (B) bei Chemerin162-Überexpression und Kontrolle, auf GAPDH-Expression normalisiert. **(D)** Hepatische CMKLR1-mRNA-Expression, auf 18S rRNA normalisiert. **(E)** Serumspiegel von Chemerin, auf das Körpergewicht normalisiert. KG, Körpergewicht; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 2113 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen Chemerin- und CMKLR1-Expression und des systemischen Chemerin-Spiegels bei Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. KO, Kontrolldiät; ÜE, Chemerin162-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Chemerin/18S rRNA	0,48	1,04	0,49	1,01	± 0,06	± 0,25	0,001
Chemerin/GAPDH [au]	0,69	1,15	0,84	1,41	± 0,59	± 0,61	n.s.
CMKLR1/18S rRNA	1,25	0,67	1,18	0,74	± 0,46	± 0,36	n.s.
Chemerin/KG [ng/ml/g]	4,03	8,44	4,14	8,14	± 1,84	± 2,82	0,017

3.3.2.2 Analyse des Körper- und Organgewichts bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH

Die Chemerin162-Überexpression hatte, verglichen mit den Kontrollen, keine Auswirkung auf das Körper-, Leber- oder Milzgewicht (s. Abb. 22 A-C; Tabelle 22). Auch der mit der MCD-Diät einhergehende Gewichtsverlust des Gesamtkörpergewichts nach zwei Wochen Fütterung war in beiden Versuchsgruppen gleich (s. Abb. 22 D; Tabelle 22). Bei der Untersuchung der Leberhistologie zeigte sich auch kein Unterschied zwischen Chemerin162-Überexpression und der Kontrolle (s. Abb. 22 E).

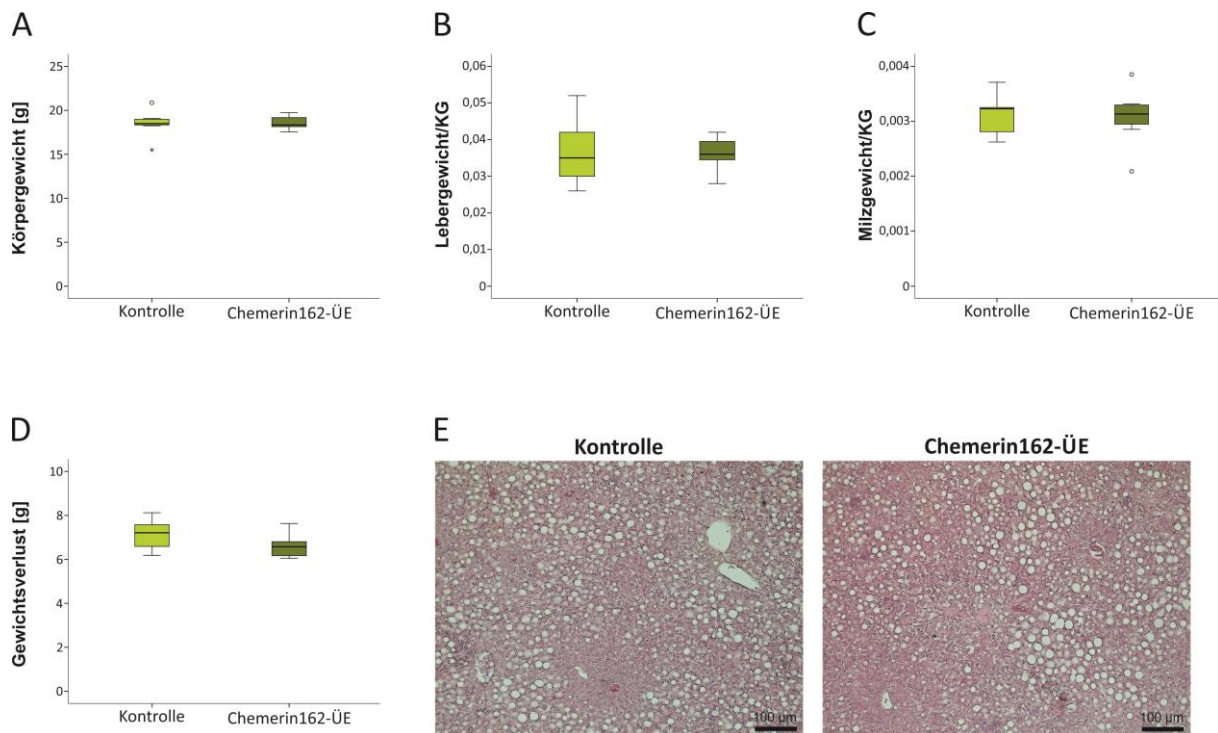


Abbildung 22 Analyse des Körpergewichts, Lebergewichts, Milzgewichts, Gewichtsverlusts und der Leberhistologie bei Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. **(A)** Körpergewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. **(B)** Normalisiertes Lebergewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. **(C)** Normalisiertes Milzgewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. **(D)** Gewichtsverlust der Kontroll-Mäuse und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. **(E)** Histologischer Leberschnitt von Kontroll- oder Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät, H&E-gefärbt. 10x Vergrößerung, Balken 100 µm. KG, Körpergewicht.

Tabelle 22 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte des Körper-, Leber- und Milzgewichts und des Gewichtsverlusts von Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin162-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Körpergewicht [g]	18,5	18,3	18,5	18,6	± 1,59	± 0,77	n.s.
Lebergewicht/KG	0,04	0,04	0,04	0,04	± 0,01	± 0,005	n.s.
Milzgewicht/KG	0,003	0,003	0,003	0,003	± 0,0004	± 0,001	n.s.
Gewichtsverlust [g]	7,2	6,6	7,1	6,6	± 0,72	± 0,56	n.s.

3.3.2.3 Einfluss von Chemerin162-Überexpression auf Serumparameter und Leberlipide in der murinen NASH

Der Spiegel des hepatoprotektiven Adipokins Adiponectin war bei Überexpression von Chemerin162 tendenziell aber nicht signifikant niedriger als bei der Kontrolle (s. Abb. 23 A; Tabelle 23).

Auf die systemischen Konzentrationen von Glukose oder Insulin hatte die Überexpression von Chemerin162 keine Auswirkung (s. Abb. 23 B, C; Tabelle 23).

Auch der Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalt in der Leber war bei Tieren mit Chemerin162-Überexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert (s. 23 D, E; Tabelle 23).

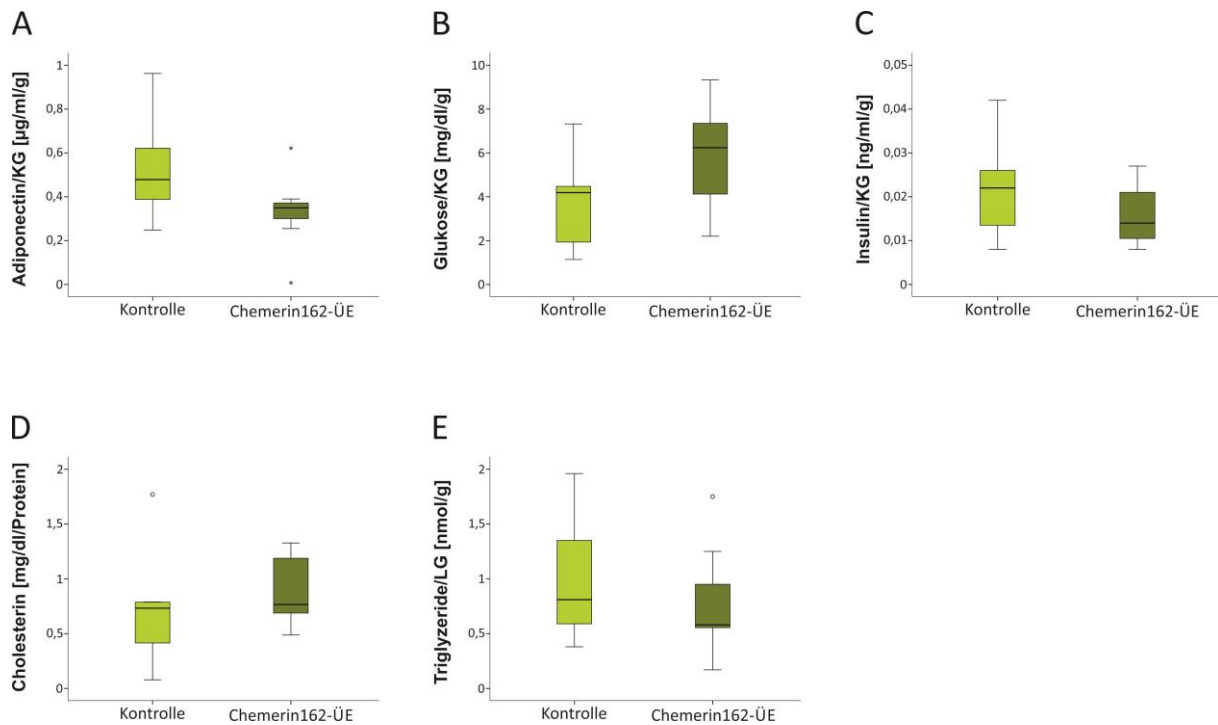


Abbildung 16 Analyse des Serumspiegels von Adiponectin, Glukose und Insulin, und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts von Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. **(A)** Serumspiegel von Adiponectin, auf das Körpergewicht normalisiert. **(B)** Blutzuckerspiegel, auf das Körpergewicht normalisiert. **(C)** Serumspiegel von Insulin, auf das Körpergewicht normalisiert. **(D)** Hepatischer Cholesterin-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. **(E)** Hepatischer Triglyzerid-Gehalt, auf das Lebergewicht normalisiert. KG, Körpergewicht.

Tabelle 23 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Serumspiegel von Adiponectin, Glukose und Insulin, und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. KG, Körpergewicht; KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin162-Überexpression ; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Adiponectin/KG [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{g}$]	0,48	0,35	0,53	0,33	$\pm 0,23$	$\pm 0,18$	n.s.
Glukose/KG [$\text{mg}/\text{dl}/\text{g}$]	4,19	6,24	3,64	5,81	$\pm 2,14$	$\pm 2,48$	n.s.
Insulin/KG [$\text{ng}/\text{ml}/\text{g}$]	0,02	0,01	0,02	0,02	$\pm 0,01$	$\pm 0,007$	n.s.
Cholesterin [$\text{mg}/\text{dl}/\text{Protein}$]	0,73	0,77	0,71	0,9	$\pm 0,5$	$\pm 0,3$	n.s.
Triglyzeride/Leber [nmol/g]	0,81	0,58	1,0	0,79	$\pm 0,61$	$\pm 0,53$	n.s.

3.3.2.4 Hepatische Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH

Bei der MCD-induzierten NASH kommt es durch die Entzündung der fettbeladenen Hepatozyten zur signifikanten Erhöhung der Expression inflammatorischer Markergene (s. Abb. 20) [307].

Um den Einfluss der Überexpression von Chemerin162 auf die Entzündungsvorgänge in der NASH-Leber zu untersuchen, wurde die Genexpression verschiedener pro-inflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene untersucht.

Dabei zeigte sich generell eine starke Reduktion der Expression inflammatorischer Markergene bei Überexpression von Chemerin162 im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 24; Tabelle 24), die im Falle von F4/80, CCL3 und CCL7 hoch signifikant war.

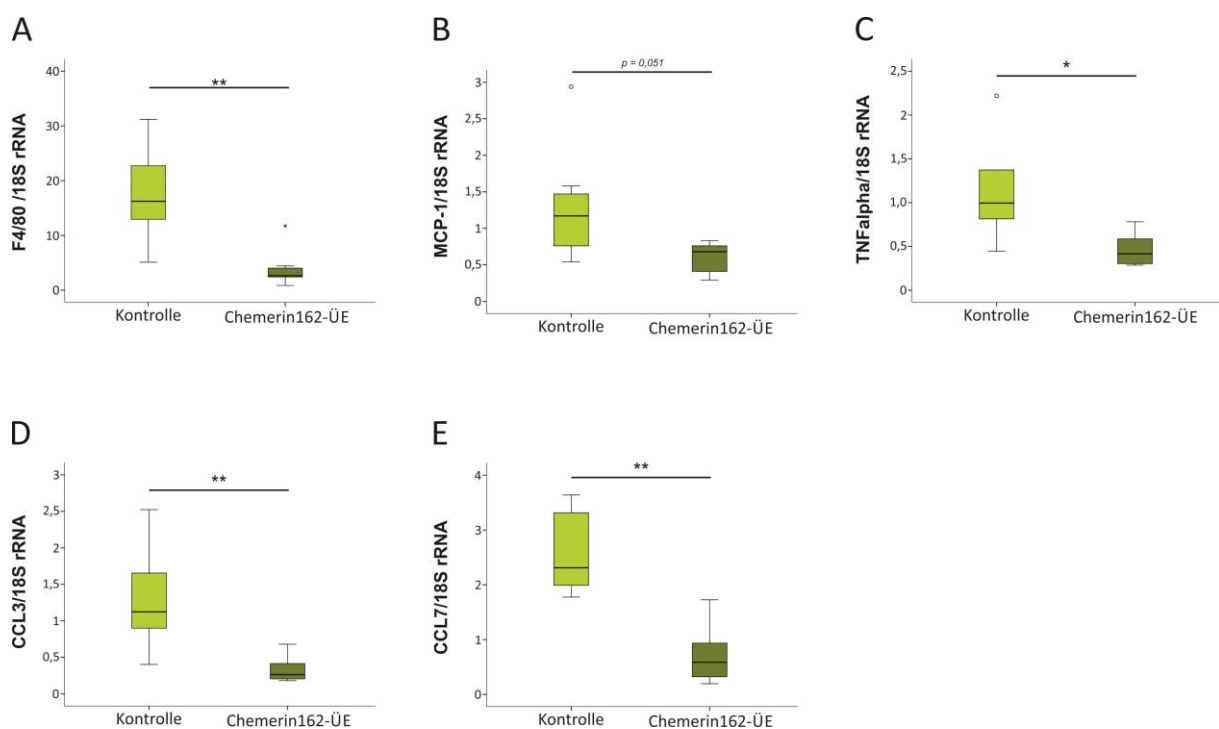


Abbildung 24 Analyse der hepatischen Genexpression inflammatorischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. **(A)** Expression des Entzündungsmarkers F4/80. **(B)** Expression des Entzündungsmarkers MCP-1. **(C)** Expression des Entzündungsmarkers TNFα. **(D)** Expression des Entzündungsmarkers CCL3. **(E)** Expression des Entzündungsmarkers CCL7. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Tabelle 24 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin162-Überexpression.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
<i>F4/80/18S rRNA</i>	16,25	2,68	17,43	4,05	± 8,86	± 3,58	0,004
<i>MCP-1/18S rRNA</i>	1,17	0,68	1,30	0,61	± 0,81	± 0,21	0,051
<i>TNFα/18S rRNA</i>	0,99	0,42	1,14	0,47	± 0,61	± 0,21	0,017
<i>CCL3/18S rRNA</i>	1,12	0,26	1,29	0,34	± 0,74	± 0,19	0,009
<i>CCL7/18S rRNA</i>	2,31	0,59	2,61	0,73	± 0,82	± 0,55	0,004

3.3.2.5 Hepatische Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH

Durch die Schädigung der Leber werden die hepatischen Sternzellen aktiviert und die Expression profibrotischer profibrotischer Markergene erhöht (s. Abb. 20, Tabelle 20) [308].

Die Expression der fibrotischen Markergene α -SMA, Col1a1, CTGF und TGF β waren bei Mäusen mit hepatischer Chemerin162-Überexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt (s. Abb. 25, Tabelle 25).

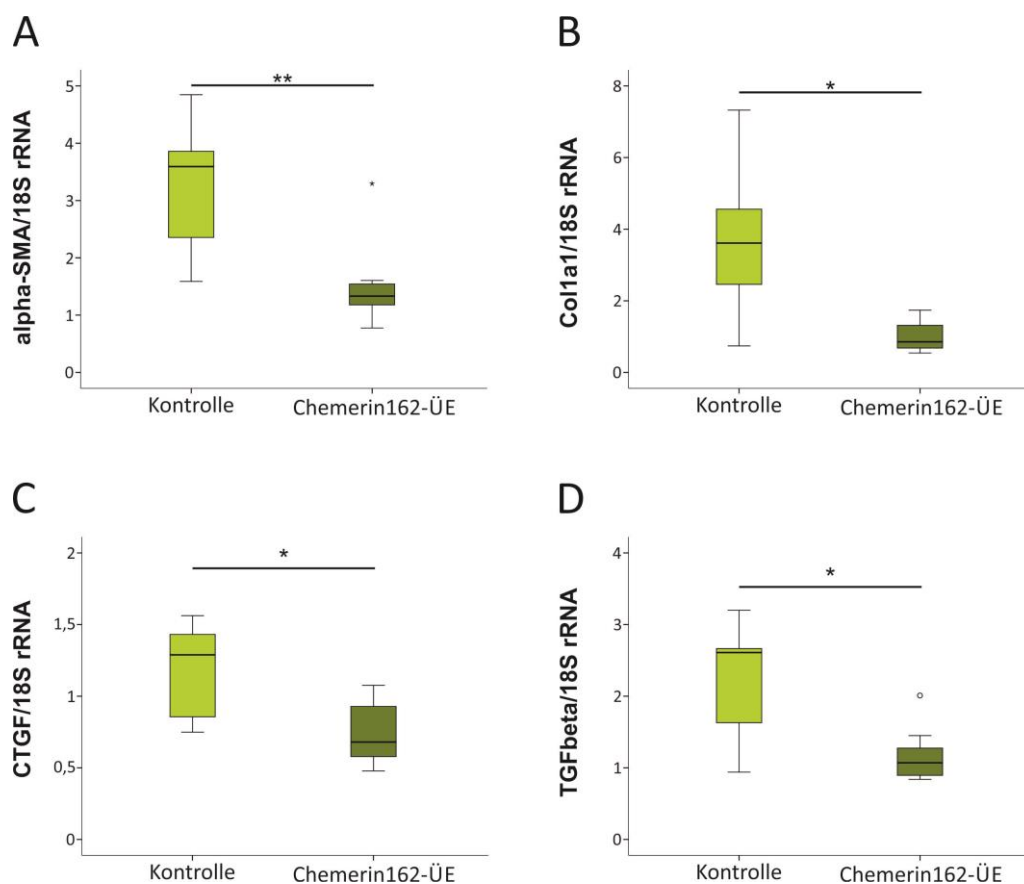


Abbildung 25 Analyse der hepatischen Genexpression fibrotischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. (A) Expression des Fibrosemarkers α -SMA.

(B) Expression des Fibrosemarkers Col1a1. (C) Expression des Fibrosemarkers CTGF. (D) Expression des Fibrosemarkers TGF β . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. *p < 0,05, ** p < 0,01.

Tabelle 25 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression fibrotischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin162-Überexpression.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
α -SMA/18S rRNA	3,59	1,33	3,21	1,55	$\pm 1,22$	$\pm 0,81$	0,038
Col1a1/18S rRNA	3,61	0,85	3,67	0,99	$\pm 2,16$	$\pm 0,45$	0,004
CTGF/18S rRNA	1,29	0,68	1,19	0,75	$\pm 0,32$	$\pm 0,23$	0,035
TGF β /18S rRNA	2,61	1,07	2,19	1,18	$\pm 0,84$	$\pm 0,42$	0,026

3.3.2.6 Hepatische Expression von Immunzellmarkern bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH

Als gewebspezifische Schutz- und Regenerationsfunktion beim Eindringen von Pathogenen oder Reizstoffen und nach physikalischer Zell-/Gewebschädigung sind bei der Entzündung vor allem Immunzellen wichtige Mediatoren, die für die Wiederherstellung der Gewebekomöostase verantwortlich sind [309].

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der hepatischen Überexpression von Chemerin162 auf das Entzündungsgeschehen in der murinen NASH-Leber wurde mittels Expressionsanalyse das Vorhandensein bestimmter Subpopulationen von Immunzellen analysiert.

Die Präsenz von Makrophagen des pro-inflammatorisch wirkenden M1-Typs wurde durch die Analyse der Expression der Oberflächenmoleküle CD38 und CD68 ermittelt [310, 311]. Dabei zeigte sich, dass signifikant weniger M1-Typ-Makrophagen bei der Überexpression von Chemerin162 in der Leber nachzuweisen sind (s. Abb. 26 A, B; Tabelle 26).

Die Expression des Oberflächenmoleküls CD163 wurde zur Analyse der M2-Makrophagen verwendet [312]. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war der Anteil an M2-Makrophagen in der Leber bei den Chemerin162-überexprimierenden Tieren signifikant erhöht (s. Abb. 26 C; Tabelle 26).

Als NK-Zell-spezifische Marker wurde die Expression der Rezeptoren Ly49C und Ncr1 untersucht [313, 314]. Dabei zeigte sich bei der Chemerin162-Überexpression eine teilweise signifikante Reduktion der Markerexpression von NK-Zellen (s. Abb. 26 D, E; Tabelle 26).

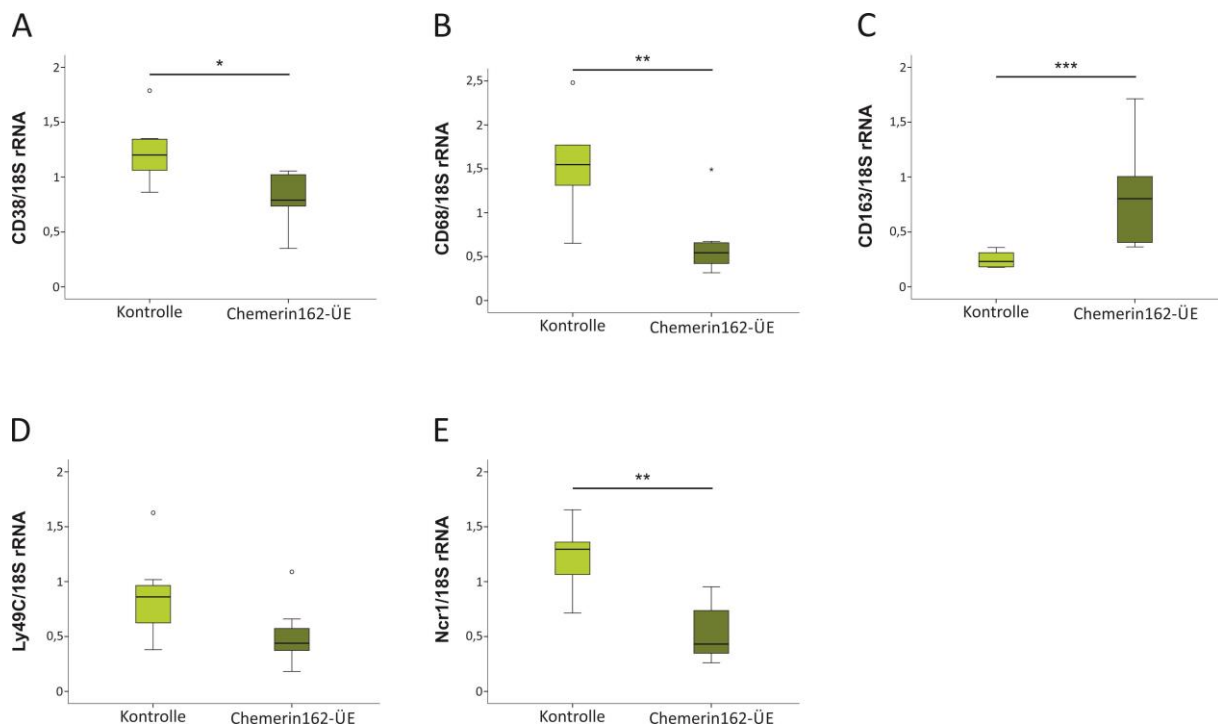


Abbildung 26 Analyse der hepatischen Genexpression von Makrophagen- und NK-Zell-Markergenen bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. (A) Expression des M1-Makrophagen-Markers CD38. (B) Expression des M1-Makrophagen-Markers CD 68. (C) Expression des M2-Makrophagen-Markers CD163. (D) Expression des NK-Zell-Markers Ly49C. (E) Expression des NK-Zell-Markers Ncr1. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 26 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression von Makrophagen- und NK-Zell-Markergenen bei Kontroll-Mäusen und Chemerin162-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin162-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
CD38/18S rRNA	1,2	0,79	1,24	0,82	± 0,29	± 0,25	0,017
CD68/18S rRNA	1,55	0,54	1,55	0,64	± 0,59	± 0,39	0,008
CD163/18S rRNA	0,23	0,80	0,25	0,85	± 0,075	± 0,49	0,001
Ly49C/18S rRNA	0,86	0,44	0,86	0,52	± 0,39	± 0,29	n.s.
Ncr1/18S rRNA	1,29	0,43	1,22	0,54	± 0,35	± 0,28	0,01

3.3.2.7 Messung der Chemerin-Aktivität im Serum bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH mittels Tango-Assay

Mit Hilfe des ELISA-Assays kann zwar die Konzentration von Chemerin im Serum der Versuchstiere festgestellt werden, da aber der DuoSet® ELISA von R&D, der in dieser Arbeit verwendet wurde, alle Chemerin-Isoformen erkennt, kann keine Aussage über die einzelnen Chemerin-Isoformen und die generelle Chemerin-Aktivität im Serum getroffen werden. Dies ist jedoch vor allem in Bezug auf die hepatische Überexpression von Chemerin162, das laut Literatur als inaktives Proprotein erst noch

von Proteasen im extrazellulären Raum prozessiert werden muss [201], und die dabei beobachteten Veränderungen der Genexpression im NAFLD-Modell interessant.

Die Aktivität von Liganden wie Chemerin kann mittels eines Assays, bei dem die Aktivierung eines Rezeptors durch den untersuchten Liganden quantifiziert wird, gemessen werden. In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Christopher Sinal der Dalhousie Universität in Halifax (Nova Scotia, Kanada) die Aktivität von Chemerin im Serum der Versuchstiere mittels des Tango-Assays für GPCRs untersucht.

Nach der Messung der Aktivierung der GPCRs CMKLR1 und GPR1 durch Serumproben von Chemerin162-überexprimierenden Tieren und von Kontrollen, wurde mit der gemessenen Biolumineszenz anhand einer Standardkurve aus rmChemerin die korrelierenden Mengen an aktivem Chemerin errechnet.

Für die Messungen wurden jeweils zwei gepoolte Seren-Proben für Kontrolle und Chemerin162-ÜE verwendet.

Die Untersuchung der CMKLR1-Aktivierung deutet im Vergleich zu den Kontrolltieren eine Reduktion des aktiven Chemerins im Serum der Chemerin162-überexprimierenden Tiere an (s. Abb. 27 A).

Im Falle von GPR1 scheint der Rezeptor durch die im Serum vorhandenen Chemerin-Isoformen bei Chemerin162-Überexpression stärker aktiviert zu werden als durch das Serum der Kontrolltiere (s. Abb. 27 B).

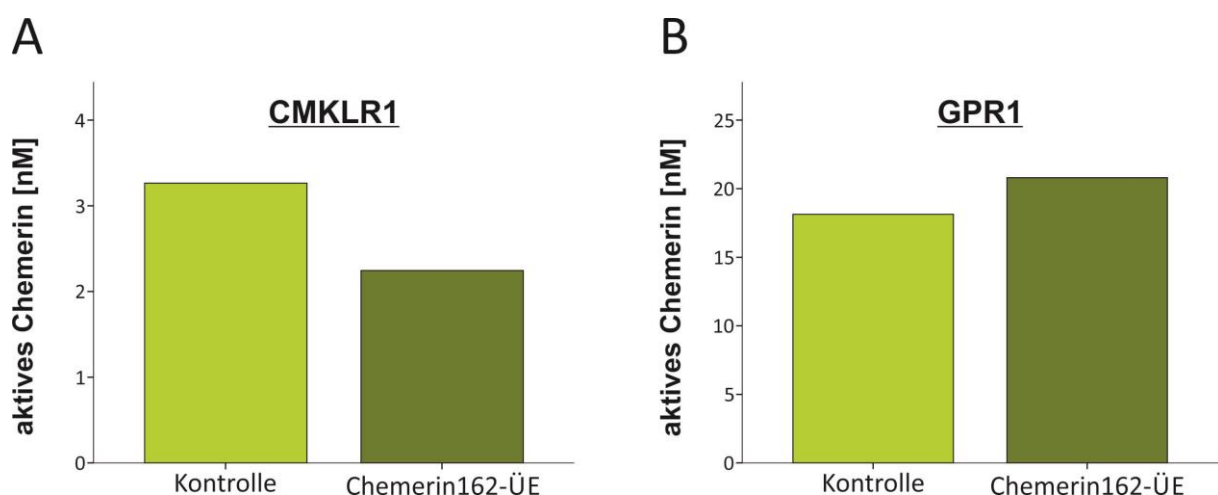


Abbildung 27 Messung des aktiven Chemerins anhand der Aktivierung der GPCRs CMKLR1 und GPR1 im Serum von Chemerin162-überexprimierenden Tieren und Kontrolltieren nach 2 Wochen MCD-Diät.

(A) Aktives Chemerin im Serum bei Kontrolle und Chemerin162-ÜE in Bezug auf Chemerin-Rezeptor CMKLR1.

(B) Aktives Chemerin im Serum bei Kontrolle und Chemerin162-ÜE in Bezug auf Chemerin-Rezeptor GPR1.

3.3.2.8 Massenspektrometrische Analyse der Chemerin-Isoformen im Leberlysat bei Überexpression von Chemerin162 in der murinen NASH

Um die weitere Prozessierung des überexprimierten Prochemerins in der Leber näher zu untersuchen, wurde Chemerin-Protein mittels IP aus Leberlysaten präzipitiert und nach Aufreinigung über ein SDS-Gel massenspektrometrisch untersucht.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben von drei Chemerin162-überexprimierenden Tieren und von zwei Kontrolltieren wurde in der *core facility* der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Deutzmann der Universität Regensburg von Dr. Astrid Bruckmann durchgeführt. Für die Massenspektrometrie wurde Chemerin aus dem Gel eluiert und mit Trypsin verdaut.

Es wurden bei der Analyse der ÜE-Proben bis zu 4 einzelne Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 37,4 % gefunden. Die Analyse der Kontrollproben ergab bis zu 5 einzelne Peptide aus der Chemerin-Sequenz mit einer Sequenzabdeckung von 45,8%.

Es wurde nur ein C-terminales Chemerin-Peptid identifiziert, das der Sequenz „IAQAGEDPHGYFLPGQFAF“ von Aminosäure 137 bis 155 des murinen Chemerins entspricht (s. Abb. 28). Während an Position 137 in der Aminosäuresequenz von Prochemerin eine Trypsinschnittstelle vorhanden ist, wird Prochemerin bei Position 155 nicht geschnitten. Die Länge und Position der anderen gefundenen Peptide entsprach der Kartierung der Trypsin-Schnittstellen in Prochemerin.

Die Chemerin155-Isoform wurde in zwei Proben der Chemerin162-Überexpression und in einer Probe der Kontrolle gefunden.



Abbildung 28 Sequenz des C-Terminus von Prochemerin Chemerin162 mit den Trypsinschnittstellen (rosa). Trypsin schneidet Prochemerin am C-Terminus zwischen den Positionen 136-137, 157-158 und 160-161. Mittels Massenspektrometrie wurde in Leberlysaten bei Chemerin162-ÜE und Kontrolle nur die Chemerin155-Isoform („...GQFAF“) identifiziert. Neben Chemerin156 ist Chemerin155 laut Literatur ebenfalls bioaktiv [315].

3.3.3 AAV-vermittelte hepatische Chemerin156-Überexpression im murinen NASH-Modell

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von Chemerin in der NAFLD wurde die Chemerin-Isoform Chemerin156 mittels AAVs in der Leber von C57BL/6-Mäusen überexprimiert und durch zweiwöchige Fütterung der MCD-Diät die NASH induziert.

Chemerin156 entsteht durch Prozessierung des Proproteins Chemerin162 und ist laut Literatur die Chemerin-Isoform mit der höchsten biologischen Aktivität [201].

Den C57BL/6-Mäusen wurde i.p. 1×10^{11} AAVs injiziert, die die Sequenz des Proproteins Chemerin156 auf ihrem Expressionsplasmid tragen und in das Wirtsgenom integrieren. Als Kontrolle wurden Mäuse mit AAVs infiziert, die keine kodierende Sequenz auf ihrem Expressionsplasmid tragen. Anschließend wurde durch Fütterung einer Methionin- und Cholin-defizienten Diät für zwei Wochen die NASH induziert und die Tiere wie beschrieben präpariert (s. Kap. 2.2.2.1).

3.3.3.1 Analyse der hepatischen Chemerin156-Überexpression auf mRNA- und Proteinebene

Die Überexpression von Chemerin156 in der Leber wurde auf mRNA- und Proteinebene überprüft. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine hoch signifikante Erhöhung der hepatischen Chemerin-Expression bei Chemerin156-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abb. 29 A; Tabelle 27). Entsprechend war auch auf Proteinebene die Chemerin-Expression in der Leber bei den überexprimierenden Tieren signifikant erhöht (s. Abb. 29 B, C; Tabelle 27).

Wie bei der Überexpression des full-length Proteins war die Expression von CMKLR1 bei der Chemerin156-ÜE tendenziell erniedrigt (s. Abb. 29 D; Tabelle 27).

Zudem wurde der systemische Chemerinspiegel im Serum mittels ELISA gemessen. Dabei zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Chemerinmenge bei den Chemerin156-überexprimierenden Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 29 E; Tabelle 27), die aber nicht signifikant war.

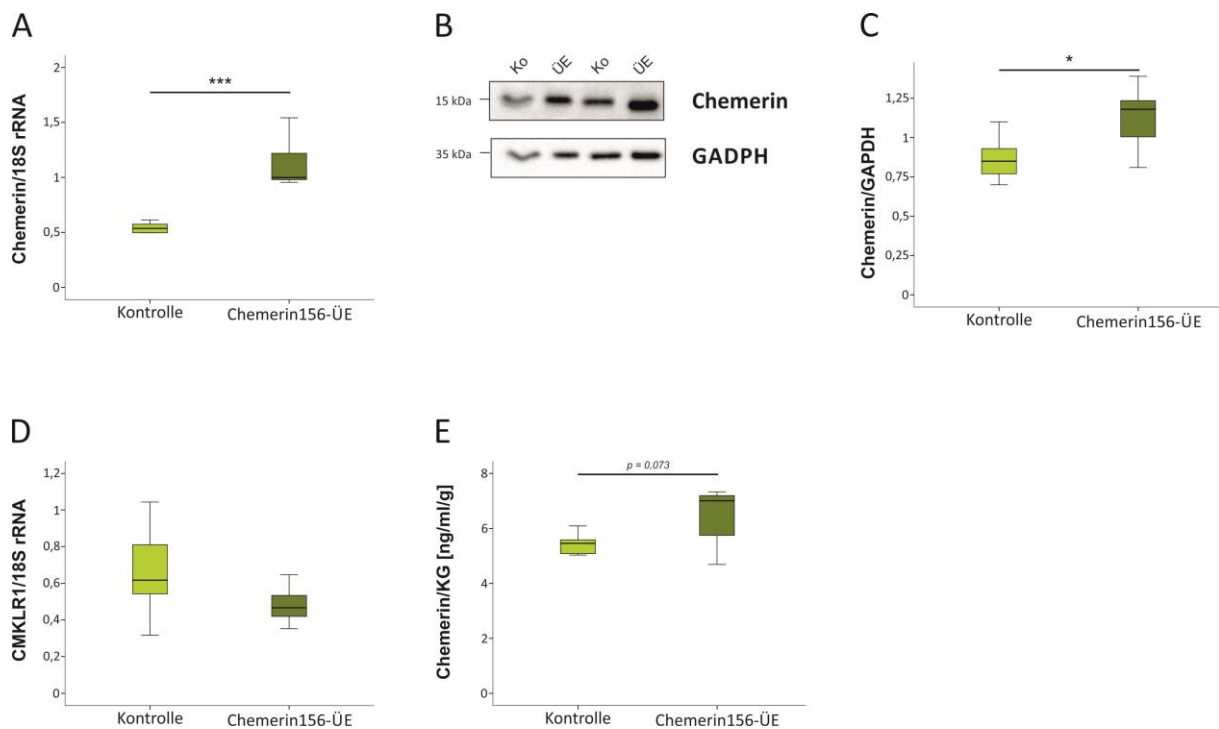


Abbildung 17 Analyse der hepatischen Chemerin- und CMKLR1-Expression und des systemischen Chemerinspiegels bei Kontrollen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. (A) Hepatische Chemerin-mRNA-Expression, auf 18S rRNA normalisiert. (B) Western Blot-Analyse der hepatischen Proteinexpression von Chemerin und GAPDH. (C) Quantifizierung der hepatischen Chemerin-Proteinexpression aus (B) bei Chemerin156-Überexpression und Kontrolle, auf GAPDH-Expression normalisiert. (D) Hepatische CMKLR1-mRNA-Expression, auf 18S rRNA normalisiert. (E) Serumspiegel von Chemerin, auf das Körpergewicht normalisiert. KG, Körpergewicht. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 14 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen Chemerin- und CMKLR1-Expression und des systemischen Chemerinspiegels bei Kontrollen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. KO, Kontrolldiät; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p – Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Chemerin/18S rRNA	0,54	0,99	0,54	1,13	± 0,05	± 0,23	0,001
Chemerin/GAPDH [au]	0,85	1,18	0,87	1,12	± 0,14	± 0,20	0,035
CMKLR1/18S rRNA	0,62	0,47	0,66	0,48	± 0,25	± 0,10	n.s.
Chemerin/KG [ng/ml/g]	5,45	7,00	5,44	6,41	± 0,39	± 1,02	n.s.

3.3.3.2 Analyse des Körper- und Organgewichts bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH

Im Gegensatz zur Überexpression des full-length Chemerins hatte die hepatische Überexpression von Chemerin156 signifikante Auswirkungen auf das Körper- und Lebergewicht der Tiere (s. Abb. 30 A, B; Tabelle 28). Hier zeigte sich, dass die Tiere bei Chemerin156-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant geringeres Körpergewicht hatten (s. Abb. 30 A; Tabelle 28).

Das Lebergewicht hingegen war bei den Chemerin156-exprimierenden Tieren nach 2 Wochen MCD-Diät signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 30 B; Tabelle 28). Dieser Unterschied im Gewicht der Leber in Bezug auf das Körpergewicht wird auch sehr gut durch den Vergleich der Korrelation von Körper- und Lebergewicht innerhalb der Versuchsgruppen dargestellt (s. Abb. 30 C).

Weiterhin zeigte sich auch, dass die Tiere bei Chemerin156-Überexpression ein hoch signifikant höheres Milzgewicht aufwiesen als die Tiere der Kontrollgruppe (s. Abb. 30 D; Tabelle 28).

Der Gewichtsverlust der Tiere beider Versuchsgruppen nach 2 Wochen MCD-Diät war im Gegensatz zum Gewichtsverlust bei Chemerin162-Überexpression und den entsprechenden Kontrollen signifikant unterschiedlich, da die Tiere mit hepatischer Überexpression von Chemerin156 nach 2 Wochen MCD-Diät signifikant weniger Gewicht verloren hatten als die Kontrolltiere (s. Abb. 30 E; Tabelle 28).

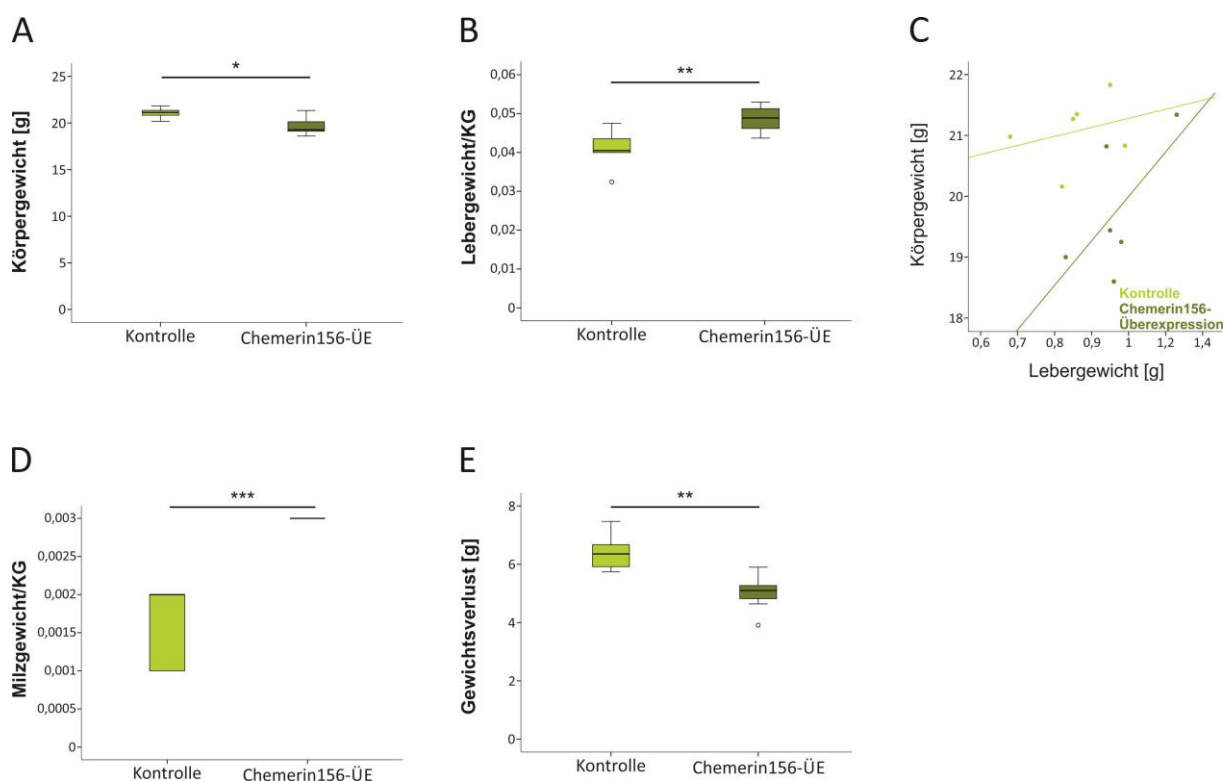


Abbildung 30 Analyse des Körpergewichts, Lebergewichts, der Korrelation von Körper- und Lebergewicht, des Milzgewichts und des Gewichtsverlusts nach 2 Wochen MCD-Diät und Chemerin156-Überexpression.

(A) Körpergewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (B) Normalisiertes Lebergewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (C) Vergleich der Korrelation zwischen Körper- und Lebergewicht von Kontrollmäusen und Chemerin156-exprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (D) Normalisiertes Milzgewicht von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (E) Gewichtsverlust der Kontroll-Mäuse und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. KG, Körpergewicht. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Tabelle 28 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte des Körper-, Leber- und Milzgewichts und des Gewichtsverlusts von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Körpergewicht [g]	21,13	19,28	21,07	19,68	± 0,56	± 1,01	0,022
Lebergewicht/KG	0,04	0,05	0,04	0,05	± 0,005	± 0,003	0,008
Milzgewicht/KG	0,002	0,003	0,002	0,003	± 0,0005	± 0,000	0,001
Gewichtsverlust [g]	6,36	5,1	6,42	5,01	± 0,62	± 0,62	0,002

Bei der Analyse der Fettgewebe zeigte sich im Gegensatz zum Körper- und Lebergewicht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (s. Abb. 31 A-C; Tabelle 29).

Die Untersuchung der Histologie durch Analyse H&E-gefärbter Leberschnitte ergab auch keinen Unterschied in der Morphologie der Hepatozyten und dem Grad und der Verteilung der Fetteinlagerung bei Chemerin156-überexprimierenden Tieren und Kontrolltieren (s. Abb. 31 D).

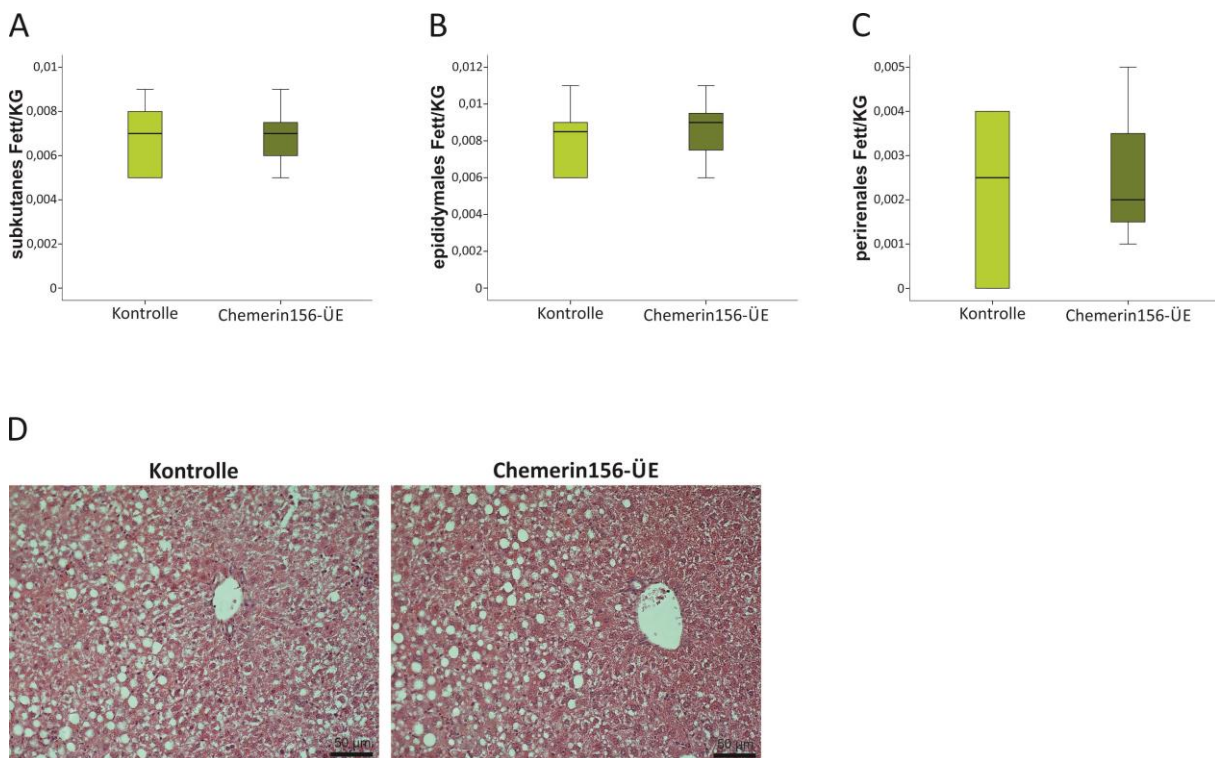


Abbildung 31 Analyse des normalisierten subkutanen, epididymalen und perirenenalen Fettgewichts, und der Leberhistologie. (A) Normalisiertes Gewicht des subkutanen Fettgewebes von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (B) Normalisiertes Gewicht des epididymalen Fettgewebes von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (C) Normalisiertes Gewicht des perirenenalen Fettgewebes von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. (D) Histologischer Leberschnitt von Kontroll- und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät, H&E-gefärbt. 20x Vergrößerung, Balken 50 µm. KG, Körpergewicht.

Tabelle 29 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte des subkutanen, epididymalen und perirenal Fettgewebes von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät, normalisiert auf das Körpergewicht. KG, Körpergewicht; KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
subkutanes Fett/KG	0,007	0,007	0,007	0,007	± 0,002	± 0,0014	n.s.
epididymales Fett/KG	0,009	0,009	0,008	0,009	± 0,002	± 0,002	n.s.
perirenales Fett/KG	0,003	0,002	0,002	0,003	± 0,002	± 0,002	n.s.

3.3.3.3 Einfluss von Chemerin156-Überexpression auf Serumparameter und Leberlipide in der murinen NASH

Bei der Untersuchung des systemischen Spiegels des hepatoprotektiven Adipokins Adiponectin zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen auf MCD-Diät (s. Abb. 32 A; Tabelle 30).

Auch der intrahepatische Cholesterin- und Triglyzeridgehalt war bei den Chemerin156-überexprimierenden Tieren und den Kontrolltieren nach 2 Wochen MCD-Diät ähnlich (s. Abb. 32 B, C; Tabelle 30).

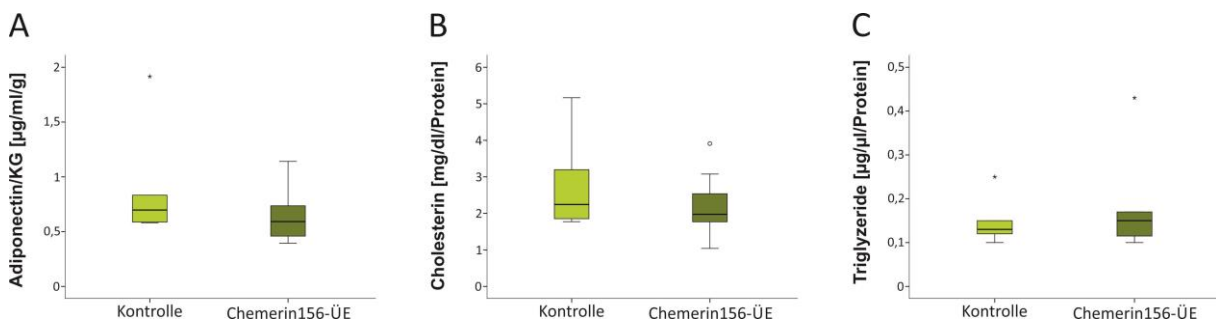


Abbildung 32 Analyse des Serumspegels von Adiponectin und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts von Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät.

(A) Serumspegel von Adiponectin, auf das Körpergewicht normalisiert. (B) Hepatischer Cholesterin-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. (C) Hepatischer Triglyzerid-Gehalt, auf die Proteinmenge normalisiert. KG, Körpergewicht.

Tabelle 30 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Serumspegel von Adiponectin und des hepatischen Cholesterin- und Triglyzerid-Gehalts bei Kontroll-Mäusen und Chemerin156-überexprimierenden Mäusen nach 2 Wochen MCD-Diät. KG, Körpergewicht; KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
Adiponectin/KG [µg/ml/g]	0,69	0,59	0,88	0,65	± 0,51	± 0,27	n.s.
Cholesterin [mg/dl/Protein]	2,24	1,98	2,75	2,22	± 1,29	± 0,96	n.s.
Triglyzeride/Leber [nmol/g]	0,13	0,15	0,15	0,18	± 0,05	± 0,11	n.s.

3.3.3.4 Hepatische Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH

Ein wichtiges Kennzeichen der NASH ist die Entzündung und damit einhergehende physiologische Prozesse, wie z.B. die Synthese und Ausschüttung von Chemokinen, wodurch Immunzellen an den Ort der Entzündung rekrutiert werden [316].

Bei der Analyse der hepatischen Expression inflammatorischer Markergene zeigte sich bei allen untersuchten Genen kein signifikanter Unterschied zwischen Chemerin156-Überexpression und der Kontrolle (s. Tabelle 31).

Tabelle 31 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression inflammatorischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
<i>CCL3/18S rRNA</i>	0,28	0,27	0,25	0,33	± 0,06	± 0,16	n.s.
<i>CCL5/18S rRNA</i>	0,50	0,53	0,53	0,58	± 0,10	± 0,17	n.s.
<i>CCL7/18S rRNA</i>	0,13	0,18	0,24	0,20	± 0,18	± 0,09	n.s.
<i>F4/80/18S rRNA</i>	0,90	0,89	0,98	1,02	± 0,24	± 0,71	n.s.
<i>IL-6/18S rRNA</i>	0,56	0,43	0,55	0,45	± 0,09	± 0,17	n.s.
<i>MCP-1/18S rRNA</i>	0,39	0,51	0,68	0,59	± 0,49	± 0,25	n.s.
<i>TNFalpha/18S rRNA</i>	0,58	0,48	0,55	0,48	± 0,09	± 0,13	n.s.

3.3.3.5 Hepatische Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression in der murinen NASH

Durch die Entzündungsvorgänge in der Leber werden bei der NAFLD die Leber-residenten Sternzellen aktiviert, wobei u.a. auch die Synthese und Sezernierung extrazellulärer Matrixmoleküle wie Kollagen induziert wird [308].

Bei der Untersuchung der hepatischen Expression fibrotischer Markergene in diesem Versuch konnte nur bei dem matrizellulären Fibrosemidiator CTGF ein signifikanter Unterschied bei Chemerin156-überxprimierenden Tieren im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden, da dessen Expression bei der Überexpression signifikant reduziert ist (s. Abb. 33 A; Tabelle 32).

Bei der Untersuchung des Verhältnisses zwischen der hepatischen Expression von CTGF und Chemerin bei allen Tieren ergab sich eine hoch signifikante, negative Korrelation der Expression beider Gene ($p = -0,841$, $p = 0,001$; s. Abb. 33 B).

Tabelle 32 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression fibrotischer Markergene bei Kontroll-Mäusen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
<i>α-SMA/18S rRNA</i>	0,84	0,68	1,12	0,71	± 0,72	± 0,14	n.s.
<i>Col1a1/18S rRNA</i>	0,69	0,65	0,77	0,79	± 0,33	± 0,32	n.s.
<i>CTGF/18S rRNA</i>	1,52	0,75	1,62	0,78	± 0,61	± 0,21	0,005
<i>TGFβ/18S rRNA</i>	0,85	0,61	0,81	0,64	± 0,16	± 0,17	n.s.

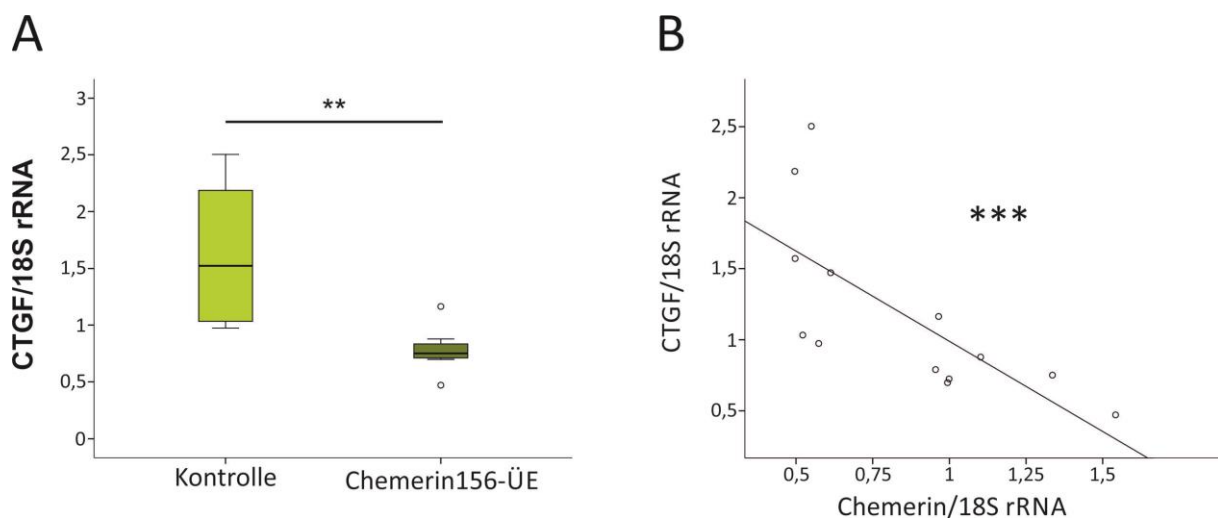


Abbildung 33 Analyse der hepatischen Genexpression des fibrotischen Markergens CTGF bei Kontroll-Mäusen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät und Korrelation der hepatischen mRNA-Expression von CTGF und Chemerin bei diesen Tieren. (A) Expression des fibrotischen Markergens CTGF, auf 18S rRNA normalisiert. (B) Korrelation der hepatischen CTGF- und Chemerin-mRNA-Expression, normalisiert auf 18S rRNA. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.3.3.6 Hepatische Expression von Immunzellmarkern bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH

Beim Einsetzen der akuten Entzündungsreaktion in der NASH spielen auch die Leukozyten des Immunsystems zur Bekämpfung der Entzündung eine große Rolle. Durch Sezernierung von Entzündungsmediatoren, die weitere Immunzellen zum Entzündungsherd rekrutieren, Phagozytose und Umstrukturierung der extrazellulären Matrix versuchen sie die Gewebekomöostase wiederherzustellen [317].

Die Untersuchung der hepatischen Expression typischer Immunzellmarker wie CD163 und Ly49C, welche auf das Vorhandensein und die Aktivität dieser Zellen schließen lässt, ergab keinen Unterschied zwischen Chemerin156-Überexpression und der Kontrolle (s. Tabelle 33).

Tabelle 33 Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der hepatischen mRNA-Expression von Makrophagen- und NK-Zell-Markergenen bei Kontroll-Mäusen und Chemerin156-Überexpression nach 2 Wochen MCD-Diät. Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. KO, Kontroll-Mäuse; ÜE, Chemerin156-Überexpression; n.s., nicht signifikant.

	Median		Mittelwert		Standardabweichung		p - Wert
	KO	ÜE	KO	ÜE	KO	ÜE	
<i>CD163/18S rRNA</i>	0,54	0,47	0,56	0,47	± 0,3	± 0,17	n.s.
<i>CD38/18S rRNA</i>	0,54	0,44	0,53	0,49	± 0,16	± 0,19	n.s.
<i>CD68/18S rRNA</i>	0,49	0,66	0,76	0,69	± 0,15	± 0,23	n.s.
<i>Ly49C/18S rRNA</i>	0,51	0,41	0,54	0,45	± 0,15	± 0,16	n.s.
<i>Ncr1/18S rRNA</i>	0,63	0,43	0,60	0,57	± 0,1	± 0,27	n.s.

3.3.3.7 Messung der Chemerin-Aktivität im Serum bei Chemerin156-Überexpression in der murinen NASH mittels Tango-Assay

Wie bei der hepatischen Überexpression von Chemerin162 wurde die Aktivität des im Serum vorhandenen Chemerins in Bezug auf die Rezeptoren CMKLR1 und GPR1 bei Chemerin156-Überexpression und Kontrollen von der Arbeitsgruppe von Professor Sinal mittels Tango-Assay untersucht. Für die Analyse wurden pro Gruppe Serum-Proben aller acht Tiere verwendet.

Die Analyse der CMKLR1-Aktivierung ergab eine generelle Erhöhung des aktiven Chemerins im Serum der Chemerin156-überexprimierenden Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren, jedoch war diese nicht signifikant (s. Abb. 34 A). Bei der Untersuchung der GPR1-Aktivierung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Bioaktivität von Chemerin im Serum in Bezug auf GPR1 (s. Abb. 34 B).

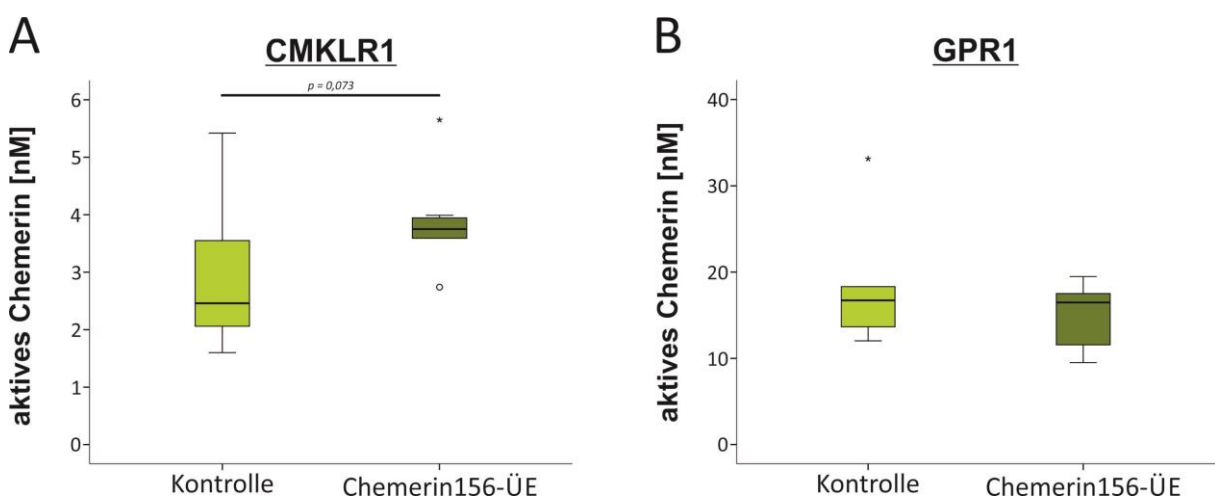


Abbildung 34 Messung des aktiven Chemerins anhand der Aktivierung der GPCRs CMKLR1 und GPR1 im Serum von Chemerin156-überexprimierenden Tieren und Kontrolltieren nach 2 Wochen MCD-Diät.

(A) Aktives Chemerin im Serum bei Kontrolle und Chemerin156-ÜE in Bezug auf Chemerin-Rezeptor CMKLR1.

(B) Aktives Chemerin im Serum bei Kontrolle und Chemerin156-ÜE in Bezug auf Chemerin-Rezeptor GPR1.

3.3.3.8 Massenspektrometrische Analyse der Chemerin-Isoformen im Leberlysat bei

Überexpression von Chemerin156 in der murinen NASH

Wie bei der Überexpression des Prochemerins wurde Chemerin-Protein im Leberlysat Chemerin156-überexprimierender Tiere und den Kontrollen präzipitiert und mittels Massenspektrometrie untersucht.

Die Analyse von 3 ÜE-Proben ergab bis zu 3 einzelne Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 27,7%. Bei der Analyse von zwei Kontrollproben wurden zwei Peptide mit einer Sequenzabdeckung von 20,6% gefunden.

Auch hier stimmte die Länge und Position der Aminosäure in den Peptiden mit dem Trypsin-Schnittmuster im Prochemerin überein, und nur bei einer Kontrollprobe wurde das C-terminale Chemerin-Peptid Chemerin155 identifiziert. In den untersuchten Überexpressions-Proben konnte kein C-terminales Peptid identifiziert werden.

3.4 Auswirkungen der Überexpression von Chemerin auf die NAFLD in vitro:

Transfektion von pHTN-Chemerin162 in Hepa1-6 mit anschließender LPS-Stimulation

Da die hepatische Überexpression des endogenen full-length Chemerin162 im murinen NASH-Modell zur teilweise sehr signifikanten Reduktion der Expression verschiedener Entzündungs- und Fibrosemarker führte, wurde im Rahmen dieses Versuchs die Auswirkungen der Chemerin162-Überexpression *in vitro* untersucht.

Dazu wurde der *open reading frame* (ORF) von Chemerin162 in das Plasmid pHTN HaloTag® CMV-neo von Promega kloniert.

Die Stimulation von Zellen mit LPS in der Zellkultur ist eine der gängigsten Methoden, um akute Entzündungsreaktionen und die zelluläre Response darauf *in vitro* zu untersuchen [318, 319].

Durch LPS wird unter anderem über die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs die Synthese proinflammatorischer Zytokine und Interferone wie IL-6 und TNF induziert [92, 320].

Die Überexpression von Chemerin162 in Hepa1-6 mit anschließender LPS-Stimulation wurde zweimal durchgeführt.

3.4.1 Transfektion von pHTN-Chemerin162 und Überexpression von Chemerin *in vitro*

Das Plasmid pHTN-Chemerin162 wurde mittels Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin3000® in Hepa1-6-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente das HaloTag-Plasmid ohne kodierende Sequenz innerhalb der *multiple cloning site*.

Nach 24-stündiger Inkubation der transfizierten Zellen im Brutschrank wurden die Zellen nach Zugabe von LPS (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) für weitere 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen auch mit entsprechenden Volumina ddH₂O, worin das LPS gelöst wurde, stimuliert. Nach dem Stimulationszeitraum wurden die Zellen geerntet, der Überstand aufgehoben und die RNA aus den Zellen isoliert. Nach RT-PCR wurde die Expression von Chemerin, CMKLR1 und einiger inflammatorischer und fibrotischer Markergene mittels rt-PCR untersucht.

Mittels LDH-Assay wurde die Zellviabilität der Hepa1-6-Zellen nach 24-stündiger LPS-Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte Laktatdehydrogenase-Aktivität in den Überständen bei der LPS-Stimulationskontrolle (s. Abb. 35 A). Die Stimulation mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen dagegen wirkte sich nicht auf die Viabilität der Zellen aus.

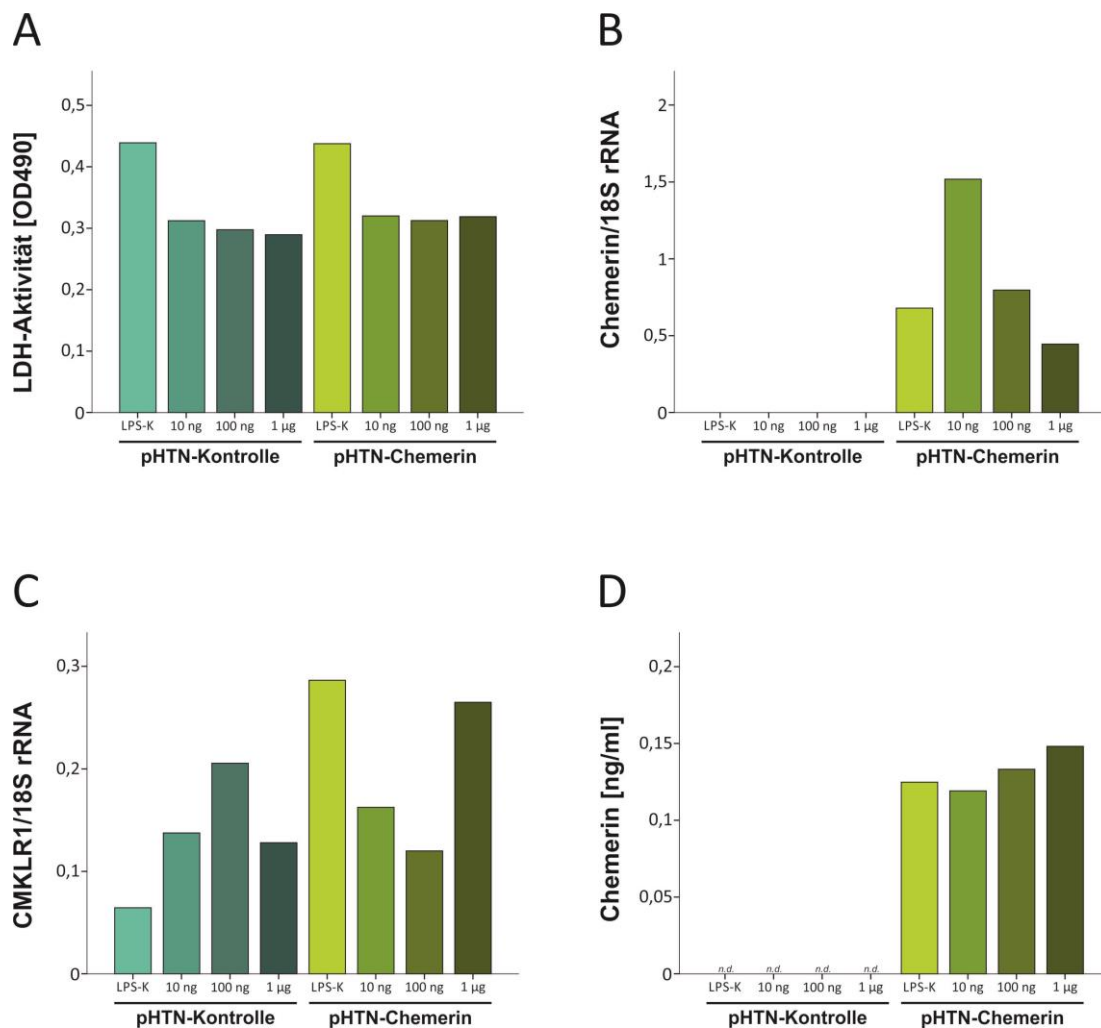


Abbildung 35 Untersuchung der Zellviabilität, Messung der Chemerin- und CMKLR1-mRNA-Expression und des Chemerin-Gehalts im Überstand nach Transfektion mit pHTN-Chemerin162 und 24-stündiger LPS-Stimulation (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml) von Hepa1-6-Zellen (Ergebnisse zweier Experimente). **(A)** Anhand der im Überstand befindlichen Laktatdehydrogenase wurde die Zytotoxizität der LPS-Stimulation auf Hepa1-6-Zellen ermittelt. **(B)** Chemerin-mRNA-Expression der transfizierten und mit LPS-stimulierten Zellen. Normalisierung auf 18S rRNA. **(C)** CMKLR1-mRNA-Expression der transfizierten und mit LPS-stimulierten Zellen. Normalisierung auf 18S rRNA. **(D)** Chemerin-Gehalt im Überstand der transfizierten und mit LPS-stimulierten Zellen. LDH, Laktatdehydrogenase; OD, optische Dichte; LPS-K, LPS-Kontrolle.

Bei der Analyse der Chemerin-Expression auf mRNA-Ebene konnte bei den mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen keine messbare Expression ermittelt werden. Im Gegenzug dazu zeigte sich bei den Zellen, die mit pHTN-Chemerin162 transfiziert wurden, eine deutliche Überexpression des Chemokins. Zudem wurde im Vergleich zur Kontrolle eine bis zu dreifach höhere Chemerin-Expression bei Stimulation mit 10 ng/ml LPS gemessen (s. Abb. 35 B).

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression des Chemerin-Rezeptors CMKLR1 zeigte sich bei der Überexpressionskontrolle eine etwa 1,5-fach bzw. 3,3-fach erhöhte Expression bei Stimulation mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zu den anderen LPS-Konzentrationen bzw. der H₂O-Kontrolle (s. Abb. 35 C). Im Gegensatz dazu war die CMKLR1-Expression bei Chemerin162-Überexpression bei der H₂O-

Kontrolle und der Stimulation mit 1 µg/ml LPS um das 1,5 – 2-fache zu den anderen Stimulationen erhöht (s. Abb. 35 C).

Chemerin wird als Proprotein von Zellen sezerniert und wird dann im extrazellulären Raum von verschiedenen Proteasen kontextabhängig C-terminal prozessiert [201]. Es bestand die Möglichkeit, dass das Fusionsprotein aufgrund des N-terminalen HaloTags in der Zelle inkorrekt prozessiert wird und nicht sezerniert wird. Um dies zu überprüfen, wurde mittels ELISA der Chemerin-Gehalt im Überstand der Zellen gemessen. Hier zeigte sich eine ähnlich hoher Chemerin-Gehalt bei allen Chemerin162-überexprimierenden Zellen, während die Chemerinkonzentration im Überstand der mit dem Kontrollplasmid transfizierten Zellen zu gering zum Messen war (s. Abb. 35 D).

3.4.2 Expression inflammatorischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression bei einem NAFLD-Modell *in vitro*

Zur Untersuchung der hepatischen Entzündungsreaktion bei Chemerin162-Überexpression in der NAFLD *in vitro* diente die Stimulation der murinen Hepatomzellen Hepa1-6 mit LPS als inflammatorisches Modell. Die Stimulation mit LPS führt unter anderem zur Induktion bzw. Steigerung der Expression inflammatorischer Gene wie IL-6 und MCP-1 [318, 321], die als Zytokine eine wichtige Rolle bei der Regulation der Entzündungsantwort durch die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen spielen [322, 323].

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression inflammatorischer Gene in diesem Versuch zeigte sich mit steigender LPS-Konzentration erwartungsgemäß jeweils eine Erhöhung der Expression von MCP-1 im Vergleich zur H₂O-Kontrolle (s. Abb. 36 A). Hierbei war jedoch kein Unterschied zwischen den Chemerin162-überexprimierenden Zellen und den Kontrollen erkennen.

Die Expression des inflammatorischen Markers IL-6 war bei den LPS-Stimulationen der pHTN-Kontrollgruppe im Vergleich zur H₂O-Kontrolle erhöht, jedoch war die Expression von IL-6 bei den Chemerin162-überexprimierenden Zellen generell höher (s. Abb. 36 B). Hier war die IL-6-Expression bei den verschiedenen LPS-Konzentrationen nur im Vergleich zur H₂O-Kontrolle um das etwa 1,6-fache erhöht, während sich das Expressionsniveau von IL-6 bei 10, 100 und 1000 ng/ml LPS nicht unterschied (s. Abb. 36 B).

Die Expression von CCL5 war bei beiden Versuchsgruppen bei LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle erhöht (s. Abb. 36 C). Zudem zeigte sich eine generelle Erhöhung der CCL5-Expression bei Chemerin162-Überexpression im Vergleich zur LPS-Kontrolle (s. Abb. 36 C).

Die Expression von TNFα wurde bei den Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, durch die Stimulation mit LPS kaum beeinflusst (s. Abb. 36 D). Im Gegensatz dazu zeigte sich durch

die LPS-Stimulation der Chemerin162-überexprimierenden Zellen ein Anstieg der TNF α -Expression, der bei der Stimulation mit 100 ng/ml LPS im Vergleich zur H₂O-Kontrolle um das etwa 1,8-fache erhöht war (s. Abb. 36 D).

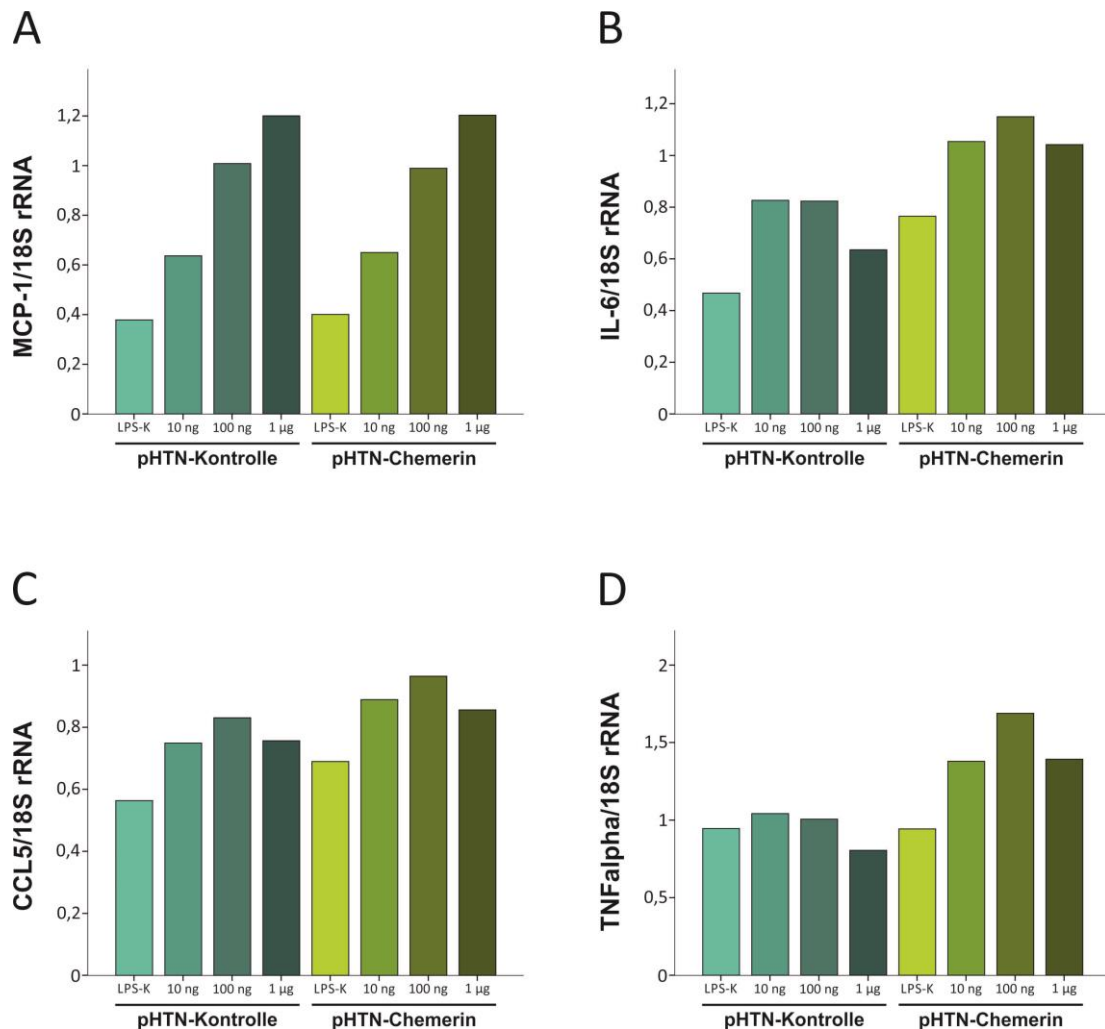


Abbildung 36 Analyse der mRNA-Expression inflammatorischer Markergene nach LPS-Stimulation bei Chemerin162-Überexpression in Hepa1-6-Zellen und entsprechender Kontrolle (Ergebnisse zweier Experimente). (A) Expression des Entzündungsmarkers MCP-1. (B) Expression des Entzündungsmarkers IL-6. (C) Expression des Entzündungsmarkers CCL5. (D) Expression des Entzündungsmarkers TNF α . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. LPS-K, LPS-Kontrolle.

3.4.3 Expression fibrotischer Markergene bei Chemerin162-Überexpression bei einem NAFLD-Modell *in vitro*

Neben der Auslösung der zellulären Entzündungsresponse führt die Stimulation mit LPS auch zur Induktion profibrotischer Markergene wie TGF β und Col1a1 [324].

Bei der Untersuchung des Fibrosemarkers α -SMA zeigte sich kein Einfluss der LPS-Stimulation auf die mRNA-Expression, sowohl bei Chemerin162-Überexpression als auch bei der Kontrolle (s. Abb. 37 A).

Die Expression von Col1a1 war bei beiden Versuchsgruppen durch die Stimulation mit LPS leicht erhöht, stieg jedoch in der Kontrollplasmid-Gruppe generell höher an als bei Chemerin162-Überexpression (s. Abb. 37 B).

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von CTGF zeigte sich generell eine kontinuierliche Reduktion der Expression des Fibrosemarkers mit steigender LPS-Konzentration, wobei es keinen Unterschied zwischen beiden Versuchsansätzen gab (s. Abb. 37 C).

Die LPS-Stimulation führte bei den Versuchsansätzen zur Erhöhung der TGF β -Expression, wobei diese bei Chemerin162-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle generell verringert war (s. Abb. 37 D).

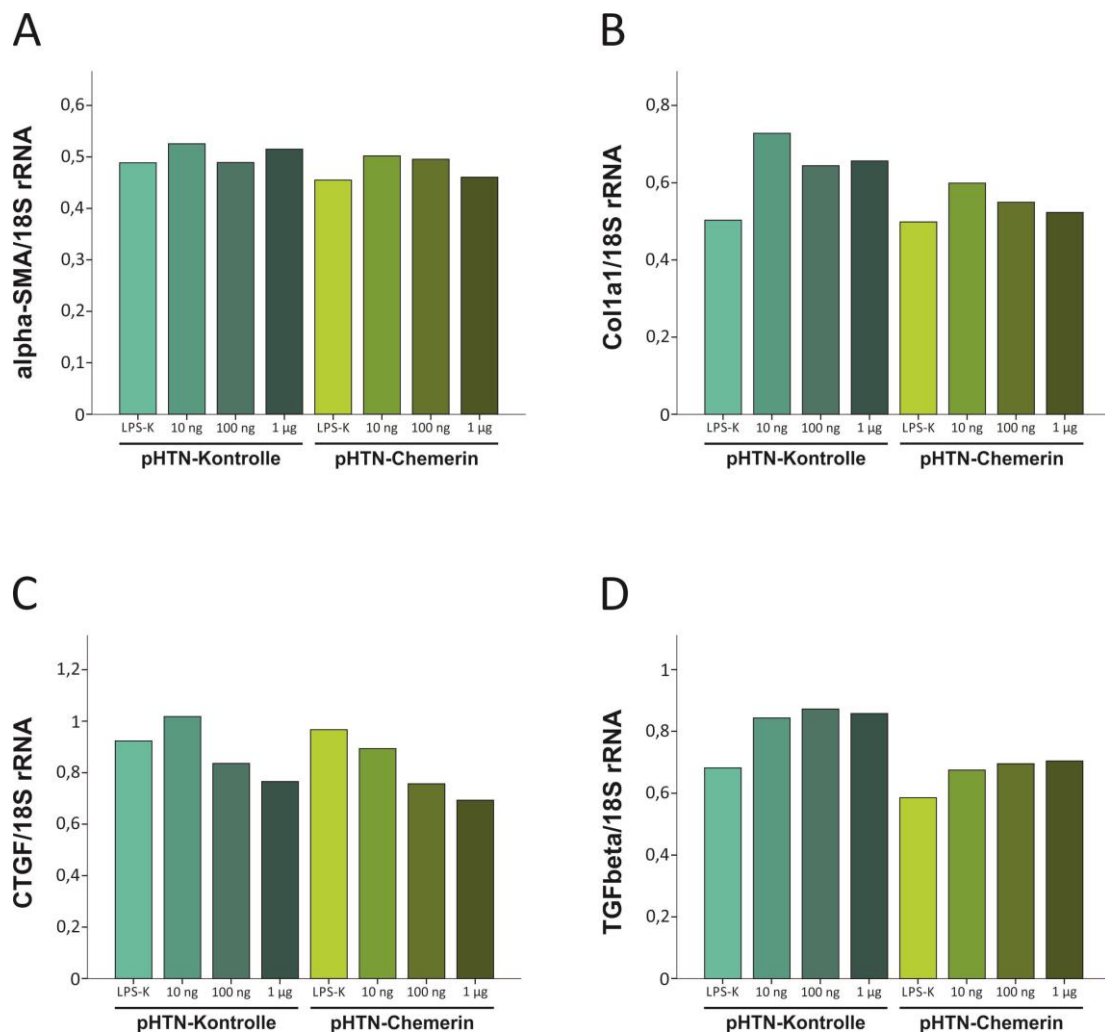


Abbildung 37 Analyse der mRNA-Expression fibrotischer Markergene nach LPS-Stimulation bei Chemerin162-Überexpression in Hepa1-6-Zellen und entsprechender Kontrolle (Ergebnisse zweier Experimente). **(A)** Expression des Fibrosemarkers α -SMA. **(B)** Expression des Fibrosemarkers Col1a1. **(C)** Expression des Fibrosemarkers CTGF. **(D)** Expression des Fibrosemarkers TGF β . Normalisierung aller Gene auf 18S rRNA. LPS-K, LPS-Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Chemerin in der humanen nicht-alkoholischen Steatohepatitis

Die Ergebnisse der Versuche dieses Kapitels wurden im Artikel „*Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis*“ im November 2016 im *European Journal of Clinical Investigation* veröffentlicht [286].

4.1.1 **Untersuchung der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression in der humanen NAFLD**

Bisher liegen zur hepatischen Expression von Chemerin in der NAFLD widersprüchliche Daten vor, die hepatische Chemerin-mRNA-Expression wurde daher in einer relativ großen Kohorte untersucht. Es ergab sich eine signifikante Reduktion der Chemerin-Expression bei den 37 eingeschlossenen Patienten mit definitiver NASH (*NASH activity score* NAS ≥ 5) im Vergleich zu den 33 Patienten mit gesunder Leber (NAS = 0) und den 39 Patienten mit Fettleber/grenzwertiger NASH (NAS < 5). Im Gegensatz dazu wurden 2013 in einer Studie zur Chemerin-mRNA-Expression in der humanen NAFLD von Döcke et al. eine signifikante Erhöhung der Expression in der NASH beobachtet wurde [325]. Dabei ist aber anzumerken, dass die NASH-Gruppe der Kohorte von Döcke et al. nur aus drei Patienten mit definitiver NASH-Diagnose bestand.

In der hier untersuchten Kohorte korreliert die mRNA-Expression von Chemerin moderat negativ mit dem NAS, dem Entzündungsgrad und dem Fibrosegrad. Mit dem Steatosegrad war die Expression hingegen nicht assoziiert, und es gab auch keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen der Kontrollgruppe und Probanden mit Fettleber/grenzwertiger NASH. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Studie von Döcke et al. [325] und schließen sich sinngemäß Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zur Chemerin-Protein-Expression in humaner und muriner Fettleber an, wo kein Unterschied in der Protein-Expression zwischen gesunder Leber und Fettleber gefunden wurde [200]. Im Gegensatz dazu beschrieben Deng et al. 2013 eine Reduktion der Chemerin-Protein-Expression in humaner und muriner Fettleber [326].

Ähnliche widersprüchliche Ergebnisse zur Chemerin-mRNA-Expression in der NASH werden auch im Tierversuch gefunden, da die Fütterung einer MCD-Diät die Expression in der Leber von Mäusen induzierte [200], aber in der Leber von Ratten verringerte [326].

In der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte ergab sich keine Assoziation der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression mit dem Geschlecht, dem BMI, dem Blutdruck oder Komorbiditäten wie T2D oder Hypercholesterinämie [286].

4.1.2 Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in der NAFLD

Bisher ist nicht geklärt, ob die Leber einen Einfluss auf den systemischen Chemerinspiegel hat. Sollte dies zutreffen, könnte sich in Analogie zur erniedrigten hepatischen Expression in der NASH ebenfalls eine verringerte Menge im Serum nachweisen lassen. Da von den unter Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Patienten kein Serum zur Verfügung stand, musste diese Analyse in einem anderen Kollektiv durchgeführt werden.

Bei der Untersuchung des systemischen Chemerinspiegels in einer NAFLD-Kohorte zeigte sich kein Unterschied zwischen den 32 Kontrollen und den 24 Probanden mit Ultraschall-gesicherter NAFLD. Das Geschlecht und eine diagnostizierte T2D-Erkrankung hatten keinen Einfluss darauf. Weiterhin ergaben sich in unserer Studie moderate positive Korrelationen des Serum-Chemerins mit dem WHR, dem systolischen Blutdruck und dem Alter der Probanden [286].

Während das Ergebnis zum Serum-Chemerin in der NAFLD in Einklang mit zwei weiteren Studien steht [325, 327], wurden bei zwei anderen Studien signifikant erhöhte systemische Chemerinspiegel in der NAFLD gefunden [328, 329].

In mehreren Analysen findet sich eine positive Korrelation des Serum-Chemerins mit der Masse des viszeralen Fettes [242-244, 330]. Chemerin wird in etwa gleichem Maße von der Leber und vom Fettgewebe exprimiert [188, 331], jedoch ist der Einfluss dieser Gewebe auf den systemischen Chemerin-Spiegel nicht endgültig geklärt und könnte auch abhängig vom Grad der Fettleibigkeit und von der Art der Lebererkrankungen sein, da zum Beispiel die Expression von Chemerin im viszeralen Fett bei Hepatosteatose und NASH reduziert ist [332]. Dies sollte bei der Analyse des Serum-Chemerins in der NASH beachtet werden, doch in den oben genannten Studien [328, 329] gibt es signifikante Unterschiede zwischen NAFLD/NASH-Gruppe und der Kontrollgruppe in Bezug auf BMI und/oder WHR, was zur Verzerrung der Ergebnisse führen könnte. In unserer Studie wurde die Population so ausgewählt, dass es keinen signifikanten Unterschied bei BMI und WHR zwischen NAFLD-Patienten und der Kontrollgruppe gibt. BMI und WHR sind mit dem systemischen Chemerin-Spiegel assoziiert, und Studien zeigen, dass ein höheres Körpergewicht mit einem erhöhtem Serum-Chemerin einhergeht [328, 329].

Unsere Ergebnisse zum systemischen Chemerin-Spiegel in der NAFLD stehen zwar in Einklang mit der Studie von Döcke et al. (2013), jedoch unterschieden sich die einzelnen Kohortengruppen von Döcke et al. signifikant voneinander in Bezug auf BMI und Taillenumfang, aber nicht im Körperfettanteil [325]. Das wiederum wirft die Frage der Bedeutung und Wichtigkeit des BMI zur Bestimmung von Übergewicht und der Bewertung gesundheitlicher Risiken auf [333, 334]. Generell sind jedoch weitere Untersuchungen der Gewebe, in denen Chemerin in hohem Maße exprimiert wird, wie dem

Fettgewebe und der Leber, und deren Rolle als primäre Quelle des zirkulierenden Chemerins vonnöten, um die Inkonsistenz in den bisherigen Studien aufzuklären.

Limitierend in dieser Studie des Serum-Chemerins in der NAFLD ist sicherlich die Anzahl der Probanden, doch im Einklang mit vorherigen Studien zu Serum-Parametern in der NAFLD [305, 335] war in dieser Kohorte der systemische Adiponectin-Spiegel erniedrigt und das Serum-Ferritin erhöht [286]. Dies zeigt, dass trotz der limitierenden Größe die Kohorte geeignet war, um die Veränderung von Biomarkern in der NAFLD festzustellen. Ein weiterer Nachteil dieser Kohorte ist, dass nicht geklärt werden kann, ob die Patienten nur eine benigne Fettleber oder bereits eine NASH entwickelt hatten.

Weiterhin ergaben sich in unserer Studie moderate Korrelationen des Serum-Chemerins mit dem systemischen Lipocalin2- und FGF21-Spiegel und der Transferrinsättigung [286], wobei letztere negativ war. Die Transferrinsättigung liegt mit einem Median von 20% in der Kontrollgruppe bzw. 21% in der NAFLD-Gruppe im Normbereich von >16% bis <45% [336]. Mit der Transferrinsättigung im Blut wird die Bindung von Eisen an das Transportprotein Transferrin angegeben und aus den Blutwerten von Eisen und Transferrin errechnet [337].

4.1.3 Einfluss von Chemerin auf die Regulation von Hepcidin und FGF21 in primären humanen Hepatozyten

Aufgrund der negativen Korrelation des Serum-Chemerins mit der Transferrinsättigung (s. Abschnitt 4.1.2) wurde zur näheren Analyse der Beziehung von Chemerin mit dem systemischen Eisenhaushalt der Einfluss von Chemerin auf den Regulator der Eisenhomöostase, Hepcidin [338], in primären humanen Hepatozyten (PHH) untersucht.

Zwar zeigte sich eine Reduktion der Hepcidin-mRNA bei Stimulation mit 600 ng/ml Chemerin, jedoch scheint Chemerin keine Auswirkung auf lösliches Hepcidin im Überstand von PHHs zu haben.

Bei der Untersuchung des Serum-Chemerins ergaben sich Korrelationen mit FGF21, einem Regulator der Glukose- und Lipidhomöostase [291], und dem hepatoprotektiven Protein Lipocalin-2 (s. Abschnitt 4.1.2).

Bei Stimulation von PHHs mit Chemerin zeigte sich eine signifikante Erhöhung der FGF21-Konzentration in den Überständen, während Lipocalin-2 unverändert war.

Dieser Zusammenhang könnte dadurch erklärt werden, dass FGF21 durch oxidativen Stress hochreguliert wird [291], wobei Chemerin die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies induzieren kann [339] und in der Adipositas auch mit Markern des oxidativen Stress assoziiert ist [340].

4.1.4 Einfluss von Regulatoren der hepatischen Lipid- und Glukose-Homöostase auf die Expression von Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Chemerin wird in der Leber von Hepatozyten und hepatischen Sternzellen exprimiert [200]. Inflammatorische Zytokine und LPS, die in der NASH erhöht sind, zeigen jedoch keine Wirkung auf die Chemerin-Expression dieser Zellen [286]. Um die Faktoren, die zu einer verringerten hepatischen Chemerin-Expression beitragen, zu identifizieren, wurde untersucht, ob nukleäre Rezeptoren, deren Aktivität in der NASH verändert ist, einen Effekt auf die zelluläre bzw. lösliche Chemerin-Proteinmenge zeigen.

4.1.4.1 Einfluss des LXR-Agonisten T0901317 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Sowohl in der Hepatozytenzelllinie HepG2 als auch in der Sternzellzelllinie LX-2 führte die Stimulation mit dem LXR-Agonisten T0901317 zur Reduktion der zellulären und löslichen Chemerin-Protein-Expression.

LXR sind wichtige Regulatoren der Glukose- und Lipidhomöostase [341], wobei LXR-Knockout-Mäuse vor einer Hochfett-Diät-induzierten Adipositas geschützt sind [342]. In der NAFLD wird die hepatische LXR-Expression induziert [343], wobei dies durch akkumulierende Oxysterole im Rahmen der Autoregulation des Rezeptors geschehen könnte [344], da der Serum-Spiegel der LXR-Liganden in der NAFLD signifikant erhöht ist [345]. Die erhöhte Expression von LXR in der NAFLD und die damit einhergehende Auswirkung auf Chemerin könnte zur geringen Chemerin-Expression in der NASH beitragen [286].

4.1.4.2 Einfluss des FXR-Agonisten GW4064 auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Die Stimulation mit dem FXR-Agonisten GW4064 wirkte sich nicht auf die Chemerin-Protein-Expression in HepG2 und LX-2 aus, führte jedoch zur signifikanten Reduktion bzw. signifikanten Erhöhung der Menge an löslichem Chemerin in HepG2- bzw. LX-2-Zellen.

FXR ist ein Modulator der Lipid- und Glukosehomöostase [294] und wird von Gallensalzen und ungesättigten Fettsäuren aktiviert [295]. Im Jahr 2013 identifizierten Deng et al. ein FXR-Response-Element im Chemerin-Gen, und zeigten, dass die Stimulation von HepG2-Zellen und PHH mit dem FXR-Agonisten GW4064 zur Induktion der Chemerin-mRNA-Expression und Chemerin-Sekretion führt [326]. Die Konzentration des Agonisten und die Behandlungsdauer bei Stimulation der Zellen mit

GW4064 in meiner Arbeit waren identisch zu den Konditionen von Deng und Kollegen. Die widersprüchlichen Ergebnisse können momentan nicht erklärt werden.

4.1.4.3 Einfluss von Rosiglitazon auf Chemerin in HepG2- und LX-2-Zellen

Wie bei dem LXR-Agonisten GW4064 hatte die Stimulation von HepG2- und LX-2-Zellen mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon keine Auswirkung auf den zellulären Chemerinproteingehalt, führte aber zur signifikanten Reduktion bzw. signifikanten Erhöhung der Menge an sezerniertem Chemerin. Rosiglitazon steigert als „Insulin-Sensitizer“ die Sensibilität von Zellen gegenüber Insulin, wobei die Effekte durch den nukleären Rezeptor PPAR γ vermittelt werden, der unter anderem auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidmetabolismus spielt [299].

Muruganandan et al. zeigten, dass die Behandlung von Mäusen mit Rosiglitazon zur Erhöhung des systemischen Chemerin-Spiegels und zur signifikanten Induktion der Chemerin-mRNA-Expression im Fettgewebe führte, während Rosiglitazon keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Chemerin in der Leber hatte [346]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der HepG2-Stimulation mit Rosiglitazon in diesem Versuch. Die Tatsache, dass Rosiglitazon aber auch die Expression von Chemerin in der Niere von diabetischen Ratten signifikant reduziert [347], zeigt, dass die Chemerin-Expression in verschiedenen Zelltypen kontrovers reguliert wird, was auch auf Hepatozyten und die hepatischen Sternzellen zutrifft.

4.2 Wirkung von Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid in der murinen nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH)

Die Ergebnisse dieses Versuches wurden im Februar 2015 im Artikel „*Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*“ im Journal *Experimental and Molecular Pathology* veröffentlicht [304].

4.2.1 Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid haben keine positive Auswirkung auf die murine NASH

Resolvin E1 und das C-terminale Chemerin-Peptid C15 zeigen in verschiedenen Erkrankungen eine anti-inflammatorische Wirkung. Die intraperitoneale Injektion einer C15-Dosis von 0,32 ng/kg Körpergewicht eine Stunde vor Induktion einer Peritonitis durch Gabe des Pyrogens Zymosan führte zur Reduktion der Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen, und einer damit einhergehenden Verringerung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 β [206]. Bei einem Natrium-Dextransulfat-induzierten Colitis-Modell schützten intraperitoneale Injektionen mit RvE1 Versuchstiere vor der Entwicklung einer Colitis, wobei die histologische

Schädigung signifikant abgeschwächt und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 β inhibiert wurde [212].

Daher wurde bei diesem Versuch in einem murinen NASH-Modell mögliche anti-inflammatorische und Entzündungs-auflösende Eigenschaften des Chemerin-C15-Peptids und des Resolvins RvE1 untersucht.

In Rahmen dieses Versuchs wurde nach Induktion der NASH an vier aufeinanderfolgenden Tagen RvE1, C15-Peptid oder PBS als Kontrolle intraperitoneal injiziert und die Tiere am fünften Tag präpariert. Es zeigte sich weder bei der RvE1- noch C15-Peptid-Behandlung ein Effekt auf den Grad der Steatose in der Leber, wie die Analyse der Leberhistologie ergab. Auch hatten beide Interventionen, gemessen an der hepatischen Expression pro-inflammatorischer und fibrotischer Gene, keinen Einfluss auf die hepatischen Entzündung und Fibrose im Vergleich zur Kontrolle. Auch zeigte sich kein Einfluss der Interventionen auf die systemischen ALT- und Adiponectinlevel.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte 2012, dass bei der durch eine Methionin- und Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät) induzierte NASH die hepatische CMKLR1-Expression signifikant verringert ist [186], was sich nachteilig auf das Signalling über diesen Rezeptor auswirken könnte. Das ist im Paigendiät-induzierten NASH-Modell aber nicht der Fall, und kann deshalb bei der Diskussion der Ergebnisse vernachlässigt werden.

Da die Fütterung der atherogenen Paigen-Diät neben der NASH-Induktion zur Erhöhung sowohl der hepatische Chemerin-Expression [200] als auch des systemischen Chemerinlevels [260] führt, könnten hohe endogene Chemerinmengen in diesem NASH-Modell zur Konkurrenz um die Rezeptorbindung führen und einen möglichen positiven Effekt von C15 und RvE1 auf die NASH abschwächen. Dagegen spricht zum Teil, dass RvE1 im Fettgewebe von ob/ob-Mäusen die Expression von Adiponectin signifikant erhöht hat [303], wobei der systemische Chemerinspiegel dieser Tiere generell sehr deutlich erhöht ist im Vergleich zu Wildtypen [348]. Da ob/ob-Mäuse aber keine erhöhte hepatische Chemerin-Expression aufweisen und wie gesagt die hepatische Chemerin-Expression in der NASH erhöht ist [200], kann der lokale Einfluss von Chemerin auf die Behandlung mit C15 und RvE1 in der Leber nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Für ω -3-Fettsäuren wurden positive Auswirkungen auf die NAFLD gezeigt [349], wobei diese Effekte wahrscheinlich hauptsächlich durch Derivate der Fettsäuren wie Resolvine und Protektine ausgeführt werden [350].

Resolvin E1 in einem mehrstufigen Syntheseprozess aus der ω -3-Fettsäure Eicosapentaensäure gebildet [350]. In einer Phase-IIb-Studie wurde jedoch keine Verbesserung der Leberhistologie in der

NASH bei Behandlung mit Ethyl-Eicosapentaensäure beobachtet, was eventuell auf eine zu geringe Dosis zurückzuführen sein könnte [351].

In Tiermodellen, in denen die Behandlung mit C15 und RvE1 zur Abschwächung und Resolution der Entzündung führten, wurden die Tiere entweder mit den Liganden vorbehandelt [206] oder die Behandlung geschah während der Induktion der Erkrankung [211, 212]. In diesem Versuch wurde die Intervention mit RvE1 und C15 bei der bereits etablierten NASH durchgeführt, und vielleicht hätte eine Vorbehandlung oder die Gabe während der Induktion der NASH zur schwächeren Ausprägung oder zum Schutz vor der Hepatosteatitis geführt. Allerdings ist dies kein geeigneter Versuchsansatz für eine mögliche therapeutische Verwendung dieser Substanzen. Auch ist es denkbar, dass eine an die NASH-Induktion anschließende Behandlung mit den Liganden über einen längeren Zeitraum als vier Tage protektive Auswirkungen gezeigt hätte.

Weiterhin könnte die intraperitoneale Injektion als Art der Verabreichung bei Lebererkrankungen im Vergleich zu Peritonitis-Modellen suboptimal sein, und die intravenöse Injektion über die Schwanzvene oder die perorale Verabreichung mit einer Schlundsonde in diesem Zusammenhang eine optimalere Methode darstellen.

Ein Punkt, der beachtet werden muss, ist, dass ein Tiermodell der NASH keine perfekte Simulation der humanen NASH ist [352]. Deswegen sollten mögliche Effekte von C15 und RvE1 auf die NASH eventuell in anderen Tiermodellen und mit höherer Dosis der Liganden, einem längerem Behandlungszeitraum oder einer Vorbehandlung mit den Liganden weiter untersucht werden.

4.2.2 Resolvin E1 erniedrigt das Nüchterninsulin

Bei der Untersuchung des systemischen Insulin-Spiegels der Tiere in den Behandlungsgruppen ergab sich eine signifikante Reduktion bei RvE1 im Vergleich zu C15.

Bei einer klinischen Studie mit übergewichtigen T2D-Patienten führte eine dreimonatige tägliche Supplementation mit Eicosapentaensäure, einem RvE1-Vorläufer, zur signifikanten Abnahme des systemischen Insulin-Spiegels und zur Verbesserung der Insulin-Sensitivität [353]. Zudem zeigte sich eine Reduktion der durch LPS induzierten Entzündung von Langerhans-Inseln, in denen sich die Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas befinden, durch Herunterregulation der Expression inflammatorischer Zytokine wie MCP-1 und RANTES (*regulated on activation, normal T Cell expressed and secreted*) [354]. Patienten mit chronischer Pankreatitis haben nüchtern signifikant höhere Blut-Insulinwerte [355] und die Entzündung von Langerhans-Inseln stellt einen Mechanismus bei T2D dar, der zur Dysfunktion oder dem Defekt der Insulin-Sekretion führen kann [356, 357]. So ist es durchaus

möglich, dass die Behandlung mit RvE1 in diesem Versuch im Pankreas anti-inflammatorisch wirkte und zur Senkung des Blut-Insulinwertes im Vergleich zur C15-Behandlung geführt hat.

Die Effekte von Chemerin auf den Insulin-Spiegel sind sowohl *in vivo* [239, 253] als auch *in vitro* [254, 255] inkonsistent, und das Chemerin-C15-Peptid hat in diesem Versuch zur tendenziellen Erhöhung des Insulin-Spiegels geführt.

4.2.3 Chemerin und CMKLR1 in der NASH-Leber

In diesem Tierversuch konnte keine Korrelation der hepatischen Chemerin-Expression mit Parametern wie dem Körpergewicht, der Fettgewebsmasse, dem hepatischen Cholesterin- oder Triglyzerid-Gehalt oder der hepatischen Expression pro-inflammatorischer oder fibrotischer Markergene gefunden werden. Im Gegensatz dazu fanden Döcke et al. (2013) in einer humanen Studie, dass die hepatische Chemerin-mRNA-Expression positiv mit dem Grad der lobulären Entzündung und dem Hepatozyten-Ballooning (Aufblähung der Hepatozyten) korreliert, und bei fortgeschrittener Fibrose der Leber zunimmt [325]. Zudem wurde gezeigt, dass die hepatische Expression von CMKLR1 in der humanen NASH erhöht ist [186, 325], während CMKLR1 keinen Einfluss auf die Entwicklung der NASH in Tiermodellen zu haben scheint [358]. Dies deutet daraufhin, dass das CMKLR1/Chemerin-System eine bedeutendere Rolle in der Entstehung und Progression der NASH im Menschen spielt als in diesem NASH-Modell, das durch eine atherogene Diät induziert wurde.

Die Untersuchung der hepatischen Chemerin-Expression ergab auf mRNA-Ebene keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen, jedoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der hepatischen Chemerin-Protein-Expression in der C15-Gruppe im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Eventuell könnte dieser posttranslationale Abbau Teil einer negativen Rückkopplungsschleife sein, die durch das C15-Peptid ausgelöst wurde und so endogene Chemerinlevel reguliert.

Bei der Analyse der hepatischen Expression auf mRNA-Ebene zeigten sich signifikante Korrelationen von CMKLR1 mit den Entzündungsmarkern F4/80, MCP-1 und TNF α und mit den Fibrosemarkern α -SMA, Col1a1 und TGF β . Keines dieser Markergene war mit der Chemerin-Expression assoziiert. Da die meisten dieser Gene hauptsächlich von Immunzellen wie Makrophagen und auch von aktivierten hepatischen Sternzellen exprimiert werden [322, 359-362], besteht die Frage, ob diese Assoziationen nur auf der Ko-Expression von CMKLR1 auf diesen Zellen [186] beruhen, oder ob diese Zusammenhänge eventuell auf eine Rolle des CMKLR1/Chemerin-Systems bei der NAFLD-Pathogenese oder deren Resolution wie zum Beispiel durch Rekrutierung von Monozyten hindeuten.

4.3 Hepatische Überexpression von Chemerin im murinen NASH-Modell

Da Chemerin in der humanen NASH-Leber erniedrigt ist [286], könnte man vermuten, dass die hepatische Überexpression von Chemerin protektive Effekte zeigt. Um dies zu klären, wurde Chemerin mittels AAVs in der Leber von Mäusen überexprimiert und anschließend durch Fütterung der MCD-Diät eine NASH induziert.

Der Erfolg der Überexpression (ÜE) der Prochemerin-Isoform Chemerin162 und der bioaktiven Isoform Chemerin156 wurde mittels Untersuchung der hepatischen Chemerin-Expression auf mRNA- und Proteinebene und der Messung des systemischen Chemerinspiegels der Mäuse bestätigt. Dabei war im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle die ÜE von Chemerin162 und Chemerin156 auf mRNA-Ebene hoch signifikant, während nur bei Chemerin156-ÜE auch die Protein-Expression signifikant erhöht war. Das Serum-Chemerin war bei beiden ÜEs generell erhöht im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nur bei Chemerin162-ÜE signifikant.

Die Chemerin-Überexpression führte bei beiden Isoformen zur tendenziellen Reduktion der hepatischen CMKLR1-mRNA-Expression, wobei mögliche *feedback loops* eine Rolle spielen könnten.

4.3.1 Die hepatische Überexpression von Chemerin156 führt zu einem erhöhten Milz- und Lebergewicht in der murinen NASH

Die Überexpression von Chemerin162 hatte keinen Einfluss auf das Körpergewicht und das normalisierte Leber- und Milzgewicht der Mäuse, und auch der mit der MCD-Diät einhergehende Gewichtsverlust war bei den Kontrollmäusen und bei Chemerin162-ÜE nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu wurde bei Mäusen mit Chemerin156-ÜE ein signifikant niedrigerer Gewichtsverlust (Mediane: 22,9% bei Kontrolle zu 21,2% bei Chemerin156-ÜE, $p = 0,001$; % des jeweiligen Ausgangsgewichts) im Rahmen der MCD-Diät festgestellt.

Weiterhin waren bei Chemerin156-ÜE das auf das Körpergewicht normalisierte Leber- und Milzgewicht signifikant höher als bei der Kontrolle. Die Fütterung der MCD-Diät führt zur exzessiven Einlagerung von Triglyzeriden in die Leber, und es wurde gezeigt, dass Mäuse, die 8 Wochen mit einer MCD-Diät gefüttert wurden, im Durchschnitt etwa 40% mehr hepatische Fettmasse hatten als Mäuse auf Standarddiät [363], wobei bei diesem Versuch geringe Mengen Methionin und Cholin im Futter vorhanden waren.

In unseren Vorarbeiten zur Überprüfung der NASH-Induktion durch die Fütterung der MCD-Diät für zwei Wochen zeigte sich kein Unterschied im Lebergewicht bei Mäusen auf MCD-Diät und auf Standarddiät, was darauf schließen lässt, dass sich signifikante Unterschiede im Lebergewicht erst nach längerer Fütterungszeit etablieren.

Die Splenomegalie beschreibt die pathologische Vergrößerung der Milz, wobei die Milz zum Teil das Zehnfache ihres Ausgangsgewichts wiegen kann [364], und ist mit der NAFLD assoziiert [365, 366]. Dabei korreliert das Verhältnis von Milz-Volumen zu Körperoberfläche mit der Schwere der NAFLD und kann zur Unterscheidung zwischen Hepatosteatose und NASH mit milder Fibrose hergenommen werden [367]. Einhergehend damit würde die signifikante Erhöhung des Milzgewichts bei Chemerin156-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle auf eine schwerere NASH-Erkrankung der überexprimierenden Tiere bei MCD-Diät hinweisen.

4.3.2 Die hepatische Überexpression von Chemerin162 führt zur Reduktion der Entzündung und Fibrose in der murinen NASH

Bei der Untersuchung der hepatischen Expression verschiedener Entzündungs- und Fibrosemarker zeigte sich bei Chemerin162-ÜE bei fast allen Markergenen eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle, während bei Chemerin156-ÜE nur die Expression des Fibrosemarkers CTGF signifikant verringert war im Vergleich zur Kontrolle. Zudem zeigte sich eine hoch signifikante negative Korrelation der Expression von CTGF und Chemerin bei Chemerin156-ÜE. Die Expression anderer pro-fibrotischer Markergene wie α -SMA oder Col1a1 war hingegen nicht beeinflusst durch Chemerin156-ÜE.

Diese signifikanten Auswirkungen auf die Entzündung und Fibrose in der murinen NASH-Leber durch Überexpression des inaktiven Pro-Proteins Chemerin162 [368] deuten darauf hin, dass das Pro-Protein nach Sekretion von Proteasen zu einer Isoform mit anti-inflammatorischen und anti-fibrotischen Eigenschaften prozessiert wird. Ob diese Prozessierung lokal begrenzt ist und z.B. nur in der entzündeten Leber durchgeführt wird, oder auch systemisch geschieht, kann nicht gesagt werden. Jedoch weist die signifikante Erhöhung des Anteils prozessierter Chemerin-Isoformen am Gesamt-Chemerin in arthritischer Synovialflüssigkeit im Vergleich zur Verteilung der Isoformen im systemischen Blutplasma [231] auf eine lokale Prozessierung am Ort der Entzündung hin.

CTGF spielt eine wichtige Rolle in der hepatischen Fibrose, da die CTGF-Produktion in Hepatozyten und HSCs durch den pro-fibrotischen Mediator TGF β induziert wird, und CTGF die Synthese von EZM-Komponenten unter anderem auch durch Aktivierung von HSCs stimuliert [369, 370].

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass der CTGF-Regulator TGF β die Chemerin-Expression in PHHs [200], HepG2 und HSCs [286] erhöht, während durch TGF β -Stimulation die CMKLR1-Expression in Hepatozyten reduziert wird [186]. Die Überexpression von Chemerin156 hatte keinen Einfluss auf die hepatische TGF β -Expression, doch CTGF wird auch durch andere Mediatoren wie Prostaglandine, cAMP oder Angiotensin II reguliert [371]. Die Bindung von Angiotensin II an den Rezeptor *angiotensin type 1 receptor* (AT1) führt neben der Aktivierung von Immunzellen [372] auch zur Induktion der

Expression pro-fibrotischer Proteine wie CTGF, TGF β und Kollagen und trägt so zur Fibrose in verschiedenen Geweben wie der Leber und der Lunge bei [373, 374]. Angiotensin II wird dabei durch die Enzyme *angiotensin converting enzyme* (ACE) [375] und Chymase [376, 377] aus Angiotensin I gebildet, und beide Enzyme degradieren Chemerin156 zu inaktiven Isoformen [201, 203, 204]. Studien haben gezeigt, dass im Sinne eines *feedback loops* die ACE-Expression in der Lunge durch Angiotensin II verringert wird [378]. Vorstellbar wäre ein Szenario, in dem die Überexpression von Chemerin156 zur Konkurrenz der Substrate um ACE und Chymase führt, und die Generation von Angiotensin II supprimiert wird, was sich auf die Stimulation der CTGF-Expression durch Angiotensin II auswirken würde. Jedoch wird die CTGF-Expression auch von anderen Mediatoren reguliert [371], aber eine mögliche funktionelle Verbindung von Chemerin mit dem Renin-Angiotensin-System, das den Wasser- und Salzhaushalt des Körpers reguliert und auch eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation spielt [379], wäre durch ACE und Chymase durchaus denkbar.

4.3.3 Die hepatische Überexpression von Chemerin162 führt zur Erhöhung von M2-Makrophagen in der NASH-Leber

Kupfferzellen sind die residenten Makrophagen der Leber und spielen bei der Entstehung der NASH eine wichtige Rolle [380, 381]. Kupfferzellen können wie andere Makrophagen auch sich durch pro- oder anti-inflammatorische Stimuli zu M1- oder M2-Makrophagen polarisieren [382, 383]. Bei der Untersuchung des Einflusses der Chemerin-ÜE auf die in der NASH-Leber vorhandenen Immunzellen, zeigte sich bei ÜE von Chemerin162 eine signifikante Reduktion von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen und NK-Zellen im Vergleich zu Kontrolle. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Erhöhung der anti-inflammatorischen M2-Makrophagen in der Leber bei Chemerin162-ÜE nachgewiesen werden. Die ÜE von Chemerin156 hatte dagegen keine Auswirkung auf die relative Menge von Makrophagen- oder NK-Zell-Markern im Vergleich zur Kontrolle.

In einem Mausmodell der NASH zeigte sich ein Anstieg von Makrophagen mit M1-Phänotyp in der Leber [112], der durch die Produktion von ROS, pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF und IL-1, und Stickstoffmonoxid charakterisiert ist. Diese Makrophagen induzieren zytotoxische und gewebebeschädigende Prozesse [384]. M2-Makrophagen hingegen setzen anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10 und Arginase frei, die inflammatorische Vorgänge supprimieren und auf die Reparatur des geschädigten Gewebes abzielen [384], was zur signifikanten Reduktion der Expression pro-inflammatorischer Markergene in diesem Versuch beigetragen haben könnte. Zudem fördert von M2-Makrophagen sekretiertes IL-10 die Apoptose von M1-Makrophagen [385].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr, da sie Tumorzellen und von Mikroorganismen befallene Zellen erkennen, und daraufhin Moleküle sekretieren, die schließlich zur Apoptose der Zielzelle führen. NK-Zellen werden durch Zytokine wie

TNF und MCP-1 [386, 387] von anderen Immunzellen aktiviert und zu ihrem Einsatzort rekrutiert, und sekretieren pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ [388, 389]. Die signifikante Reduktion von NK-Zellen bei ÜE von Chemerin162 kann somit auf die signifikant verringerte hepatische Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF α und MCP-1 zurückgeführt werden.

In einem murinen Melanom-Modell wurde jedoch gezeigt, dass die intratumorale Überexpression von Chemerin mit einer erhöhten Infiltration von NK-Zellen in den Tumor einhergeht [390]. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von NK-Zellen durch Chemerin vom pathologischen Kontext abhängig zu sein scheint.

4.3.4 Chemerin-Bioaktivität im Serum bei hepatischer Chemerin-Überexpression in der murinen NASH

Um die weitere Prozessierung der überexprimierten Chemerin-Isoformen und damit einhergehende Veränderungen der Bioaktivität näher zu untersuchen und die Divergenz der Auswirkungen auf die induzierte NASH möglicherweise zu erklären, wurde mittels des Tango-Assays die Aktivität des Chemerins in Bezug auf CMKLR1 und GPR1 im Serum der Tiere untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei Chemerin162-ÜE die Menge an aktivem Chemerin im Serum in Bezug auf CMKLR1 generell niedriger war als bei den Kontrollen. Für die Messung wurden jeweils nur zwei gepoolte Proben der ÜE und der Kontrolle verwendet.

Im Gegensatz dazu war die Menge an bioaktivem Chemerin im Serum in Bezug auf CMKLR1 bei Chemerin156-ÜE im Vergleich zur Kontrolle fast signifikant ($p = 0,073$) erhöht. Für diese Messung wurden Serumproben aller 8 Mäuse beider Versuchsgruppen verwendet.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien zur Prozessierung von Chemerin, bei denen Chemerin156 als die Isoform mit der höchsten Bioaktivität in Bezug auf CMKLR1 beschrieben wird, während Chemerin162 eine viel geringere Aktivität besitzt [201, 205].

Bei der Messung der Aktivität in Bezug auf GPR1 deutete sich bei Chemerin162-ÜE eine erhöhte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle an, während die GPR1-Aktivierung bei Chemerin156-ÜE und der entsprechenden Kontrolle ein ähnliches Niveau hatte.

Fraglich ist, inwiefern die exprimierten Isoformen im inflammatorischen Kontext der NASH-Leber prozessiert werden, was zur Steigerung oder der Verringerung ihrer Aktivität oder zur Degradation des Proteins führen könnte. Wie gezeigt wurde, wird Chemerin von mehreren Proteasen die von Neutrophilen und Mastzellen bei Entzündungen freigesetzt werden wie Cathepsin G, Elastase und Chymase modifiziert [315, 368]. Dabei wird Chemerin162 zu Isoformen mit hoher, geringer oder keiner Aktivität prozessiert, während Chemerin157 nur als Substrat der Chymase und der ACE zu inaktiven Isoformen prozessiert wird [201, 391].

4.3.5 Massenspektrometrische Analyse der hepatischen Chemerin-Isoformen bei hepatischer Chemerin-Überexpression in der murinen NASH

Trotz der gemessenen höheren Bioaktivität von Chemerin im Serum bei Chemerin156-ÜE lässt dies nicht auf eine höhere Bioaktivität in der Leber schließen, da vor allem im Kontext der Hepatosteatitis Proteasen, die von infiltrierenden Immunzellen freigesetzt werden, für die schnelle Inaktivierung des überexprimierten Chemerin156 sorgen könnten, während überexprimiertes Chemerin162 durch Elastase oder Cathepsin G zu Chemerin156 und Chemerin155, die beide hohe biologische Aktivität besitzen, prozessiert werden kann.

Bei einer vorläufigen massenspektrometrischen Analyse von Chemerin-Protein, das aus Leberlysat von Chemerin156- und Chemerin162-überexprimierenden Tieren präzipitiert wurde, wurde bei Chemerin162-ÜE in zwei von drei Proben nur die Isoform *Chemerin155* gefunden. In allen drei Proben der Chemerin156-ÜE wurden nur Peptidstücke gefunden, die bei Aminosäure-Position 136 C-terminal endeten, wo Chemerin von Trypsin geschnitten wird.

Auch in jeweils einer von zwei Proben der jeweiligen ÜE-Kontrollen wurde Chemerin155 nachgewiesen, was auf prozessiertes, endogenes Chemerin schließen lässt.

Diese vorläufigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die anti-inflammatorischen Effekte der Chemerin162-ÜE auf die induzierte NASH durch Chemerin155 ausgeübt werden könnten. Fraglich ist jedoch, ob Chemerin generell anti-inflammatorisch wirkt und die Überexpression diese Effekte auf die NASH potenziert, oder ob Chemerin pro-inflammatorisch wirkt, und die Überexpression des relativ inaktiven Chemerin162 das endogene Chemerin sozusagen verdünnt und durch Kompetition um den gemeinsamen Rezeptor zur Inhibition inflammatorischer Vorgänge führt.

4.4 Auswirkungen der Überexpression von Chemerin auf die NAFLD in vitro:

Transfektion von pHTN-Chemerin162 in Hepa1-6 mit anschließender LPS-Stimulation

Beim Versuch die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Chemerin162 aus dem Tiermodell in die Zellkultur durch Überexpression von Chemerin162 in der murinen Hepatozytenzelllinie Hepa1-6 und anschließender LPS-Stimulation zu übertragen, zeigten sich jedoch keine großen Unterschiede in der Expression der untersuchten Markergene im Vergleich zur Kontrolle. Es bestätigte sich zwar eine den LPS-Dosen entsprechende Regulation von MCP-1, doch zur weiteren Analyse der Daten müssen weitere Experimente in dieser Richtung gemacht werden, da dieses Experiment nur zweimal durchgeführt wurde.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Rezeptors CMKLR1 und seiner bisher beschriebenen Liganden in der nicht-alkoholischen Fettleber näher zu untersuchen. Der am besten charakterisierte Ligand, das Chemokin Chemerin, spielt durch seine Funktion als Chemoattraktans im Zusammenhang mit CMKLR1-exprimierenden Immunzellen eine bedeutende Rolle bei Entzündungen. Zudem wirken sich Zustände, bei denen die Glukose- und Lipidhomöostase gestört ist, wie zum Beispiel die Adipositas und dabei entstehende Komorbiditäten, auf die lokale und systemische Chemerin- und CMKLR1-Menge aus.

Eine Kohortenstudie zeigte, dass die hepatische Chemerin-mRNA-Expression in der NASH signifikant reduziert ist und mit dem Entzündungs- und Fibrosegrad, aber nicht dem Steatosegrad, korreliert. Weiterhin zeigte sich keine Assoziation der hepatischen Chemerin-mRNA-Expression mit BMI, Blutdruck, Typ-2-Diabetes oder dem Geschlecht.

Der systemische Chemerinspiegel war in der NAFLD im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht verändert und korrelierte signifikant mit der *waist-to-hip ratio*, dem Alter, dem systolischen Blutdruck, den systemischen FGF21- und Lipocalin-2-Leveln und der Transferrinsättigung, wobei nur letztere negativ war. Bei der näheren Untersuchung der Beziehung von Chemerin und dem Eisenstoffwechsel im Körper zeigte sich, dass Chemerin die Hepcidin-mRNA-Expression in Hepatozyten reduziert, sich aber nicht auf die Menge des freigesetzten Hepcidins auswirkt. Chemerin führte in Hepatozyten auch zur signifikanten Erhöhung von FGF21 in den Überständen.

Die Aktivität und Expression nukleärer Rezeptoren wie LXR, FXR und PPAR γ ist in der NAFLD verändert [392, 393], und der LXR-Agonist T0901317 führte zur Reduktion der zellulären und löslichen Chemerin-Protein-Expression in HepG2- und LX-2-Zellen. Dies könnte zur Reduktion der Chemerin-Expression in der NASH beitragen, da die hepatische LXR-Expression in der NAFLD induziert wird [343]. Der FXR-Agonist GW4064 und der PPAR γ -Agonist Rosiglitazon wirkten sich nicht auf die Menge des zellulären Chemerin-Proteins aus, führten aber zur Reduktion bzw. der Erhöhung der Menge des löslichen Chemerins in HepG2- und LX-2-Zellen.

Die therapeutische Applikation der CMKLR1-Liganden Resolvin E1 und Chemerin-C15-Peptid (C15), die anti-inflammatorisch wirken, zeigte keine Auswirkung auf die hepatische Expression entzündlicher und fibrotischer Genen in der murinen NASH. Die signifikante Reduktion des systemischen Nüchtern-Insulinspiegels bei Resolvin E1-Intervention in der NASH deutet auf eine Rolle des Resolvins bei entzündlichen Vorgängen im Pankreas hin. Zudem könnte die Reduktion des endogenen, hepatischen Chemerin-Proteins bei der C15-Intervention Ergebnis einer negativen Rückkopplungsschleife zur Regulation der Chemerinlevel sein. Da die hepatische Expression von

Chemerin in diesem NASH-Modell und auch bei anderen Studien mit NAFLD-Tiermodellen [358] nicht mit Parametern wie dem Entzündungs- und Fibrosegrad assoziiert ist, scheint das Chemerin/CMKLR1-System bei der Entstehung und Progression der murinen NASH, die wie hier durch eine atherogene Diät induziert wurde, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Die hepatische Überexpression von Prochemerin Chemerin162 im durch MCD-Diät-induzierten NASH-Tiermodell führte zur signifikanten Reduktion fast aller Entzündungs- und Fibrosemarker, während die Überexpression von hochaktivem Chemerin156 keine Auswirkung auf deren Expression hatte. Allein die Expression des pro-fibrotischen Markergens CTGF war durch die Chemerin156-Überexpression signifikant reduziert, wobei der Grund dafür unklar ist und dies durch weitere Experimente näher erforscht werden muss. Die Überexpression von Chemerin162 führte auch zur signifikanten Reduktion gewebeschädigender M1-Makrophagen in der Leber, während die Zahl von M2-Makrophagen, die die Reparatur des Gewebes fördern, signifikant erhöht war. Auch die Zahl zytotoxischer NK-Zellen war in der Leber bei Chemerin162-ÜE signifikant erniedrigt. Allerdings wurde dies bisher nur auf mRNA-Ebene untersucht, so dass dies durch eine immunhistochemische Analyse bestätigt werden muss.

Die Untersuchung der Bioaktivität des Serum-Chemerins bei den Überexpressionen zeigte, dass trotz der starken anti-inflammatorischen Wirkung bei Chemerin162-ÜE weniger bioaktives Chemerin im Vergleich zur Kontrolle im Serum vorhanden war, während bei Chemerin156-Überexpression die Menge des bioaktiven Chemerins im Vergleich zur Kontrolle erhöht war.

Bei der massenspektrometrischen Analyse des Leberlysats wurde bei Chemerin162-Überexpression und den Kontrollen nur die Isoform Chemerin155 identifiziert, welche Bioaktivität besitzt. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der geringen Probenzahl als vorläufig zu betrachten.

In vitro konnten die anti-inflammatorischen Effekte der Chemerin162-Überexpression in einer Hepatozytenzelllinie bisher nicht bestätigt werden.

6 Publikationen und Kongressbeiträge

6.1 Publikationen

6.1.1 Erstautorenschaften

- **Pohl R**, Rein-Fischboeck L, Meier EM, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. *Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*. Exp Mol Pathol. 2015 Feb 12. pii: S0014-4800(15)00024-6.
- **Pohl R**, Meier EM, Rein-Fischboeck L, Zimny S, Neumann M, Aslanidis C, Schacherer D, Krautbauer S, Eisinger K, Weiss TS, Buechler C. *Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human non-alcoholic steatohepatitis*. Eur J Clin Invest. 2016 Nov; 47(1):7-18.

6.1.2 Koautorenschaften

- Wanninger J, Liebisch G, Eisinger K, Neumeier M, Aslanidis C, Voggenreiter L, **Pohl R**, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C. *Adiponectin isoforms differentially affect gene expression and the lipidome of primary human hepatocytes*. Metabolites. 2014 May 23;4(2):394-407.
- Hebel T, Eisinger K, Neumeier M, Rein-Fischboeck L, **Pohl R**, Meier EM, Boettcher A, Froehner SC, Adams ME, Liebisch G, Krautbauer S, Buechler C. *Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1*. Biochim Biophys Acta. 2015 Jan 24;1851(5):527-536.
- Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, **Pohl R**, Meier EM, Weiss TS, Buechler C. *Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease*. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Nov 13;467(2):377-82.
- Eisinger K, Rein-Fischboeck L, **Pohl R**, Meier EM, Krautbauer S, Buechler C. *The adaptor protein alpha-syntrophin regulates adipocyte lipid droplet growth*. Exp Cell Res. 2016 Jul 1;345(1):100-7.
- Meier EM, Rein-Fischboeck L, **Pohl R**, Wanninger J, Hoy AJ, Grewal T, Eisinger K, Krautbauer S, Liebisch G, Weiss TS, Buechler C. *Annexin A6 protein is downregulated in human hepatocellular carcinoma*. Mol Cell Biochem. 2016 Jul;418(1-2):81-90.

- Neumann M, Meier EM, Rein-Fischboeck L, Krautbauer S, Eisinger K, Aslanidis C, **Pohl R**, Weiss TS, Buechler C. *Chemokine-like receptor 1 mRNA weakly correlates with non-alcoholic steatohepatitis score in male but not female individuals*. Int J Mol Sci 2016 Aug 18;17(8).
- Meier EM, **Pohl R**, Rein-Fischboeck L, Schacherer D, Eisinger K, Wiest R, Krautbauer S, Buechler C. *Circulating lipocalin 2 is neither related to liver steatosis in patients with non-alcoholic liver disease nor to residual liver function in cirrhosis*. Cytokine. 2016 Sep;85:45-50.
- Krautbauer S, Meier EM, Rein-Fischboeck L, **Pohl R**, Weiss TS, Sigrüener A, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. *Ceramide and polyunsaturated phospholipids are strongly reduced in human hepatocellular carcinoma*. Biochim Biophys Acta. 2016 Nov;1861(11):1767-1774. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.014.
- Krautbauer S, Haberl EM, Eisinger K, **Pohl R**, Rein-Fischboeck L, Rentero C, Alvarez-Guaita A, Enrich C, Grewal T, Buechler C, Neumeier M. *Annexin A6 regulates adipocyte lipid storage and adiponectin release*. Mol Cell Endocrinol. 2017 Jan 5;439:419-430. doi:10.1016/j.mce.2016.09.033
- Buechler C, **Pohl R**, Aslanidis C. *Pro-Resolving Molecules-New Approaches to Treat Sepsis?* Int J Mol Sci. 2017 Feb 23;18(3).
- Rein-Fischboeck L, **Pohl R**, Haberl EM, Zimny S, Neumann M, Eisinger K, Weiss TS, Krautbauer S, Buechler C. *Tubulin alpha 8 is expressed in hepatic stellate cells and is induced in transformed hepatocytes*. Mol Cell Biochem. 2017 Apr;428(1-2):161-170. doi: 10.1007/s11010-016-2926-4.
- Zimny S, **Pohl R**, Rein-Fischboeck L, Haberl EM, Krautbauer S, Weiss TS, Buechler C. *Chemokine (CC-motif) receptor-like 2 mRNA is expressed in hepatic stellate cells and is positively associated with characteristics of non-alcoholic steatohepatitis in mice and men*. Exp Mol Pathol. 2017 Jun 15;103(1):1-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.06.001.

6.2 Kongressbeiträge

6.2.1 Vorträge

Pohl R, Rein-Fischboeck L, Meier EM, Wanninger J, Weiss TS, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. *Hepatocyte chemerin in rodents protects from non-alcoholic steatohepatitis*. Summer School of the RIGeL Biomedicine Section, Kloster Weltenburg, 18.09.-19.09.2015

6.2.2 Poster

- **Pohl R**, Krautbauer S, Eisinger K, Beck M, Eichelberger L, Weiss TS, Buechler C. *Chemerin induces cell death of hepatocyte cell lines in vitro and in an in vivo xenograft model*. Healthcare integrated biobanking and multiomics biomarker analysis – International conference, Regensburg, 03.07.-05.07.2014
- **Pohl R**, Krautbauer S, Eisinger K, Buechler C. *The role of CMKLR1 and its ligands in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Summer School of the RIGeL BIOMED Section, Regen, 26.09.-27.09.2014
- **Pohl R**, Rein-Fischboeck L, Meier EM, Wanninger J, Weiss TS, Eisinger K, Krautbauer S, Buechler C. *Hepatocyte chemerin in rodents protects from non-alcoholic steatohepatitis*. 38th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 07.09.-10.09.2015
- **Pohl R**, Haberl EM, Rein-Fischboeck L, Buechler C. *Hepatic overexpression of chemerin attenuates expression of inflammatory and profibrotic genes in murine non-alcoholic steatohepatitis*. 52nd EASL International Liver CongressTM, Amsterdam, 19.04.-23.04.2017

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Christa Büchler für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die großartige fachliche Anleitung, die vielen Erklärungen und Diskussionen, die große Geduld und Hilfe bei Problemen und Fragen, das Korrekturlesen, die Erstellung des Erstgutachtens und vor allem für ihre stetige Einsatzbereitschaft zum Wohl ihrer Doktoranden und Angestellten bedanken.

Bei Prof. Dr. Ernst Tamm möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung meiner Doktorarbeit als erster Mentor, die hilfreichen Besprechungen und die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen und den Zweitprüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen, bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Charalampos Aslanidis für die Betreuung meiner Doktorarbeit als zweiter Mentor, die vielen hilfreichen Gespräche, die Hilfe bei Problemen und Fragen und die Bereitschaft, den dritten Prüfer im Prüfungsausschuss zu übernehmen.

Bei Dr. Astrid Bruckmann möchte ich mich für die Durchführung der Massenspektrometrie und die bereitwillige und nette Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt vor allem meinen zwei Lisas, der großen Lisa und der kleinen Lisa, für ihre tatkräftige Unterstützung, wenn ich sie gebraucht habe, für aufmunternde Worte, für anregende Diskussionen und Besprechungen, für Hilfe bei der ein oder anderen Berechnung, für ihre Freundschaft übers Labor hinaus und für die lustige, schöne Arbeitsatmosphäre! Wir haben zusammen schon einiges durchgestanden und waren uns nicht sicher, wie und ob wir drei das alleine auf die Reihe kriegen, aber wir haben es geschafft! ☺

Auch bei Dr. Sabrina Krautbauer möchte ich mich ganz herzlich für ihre Hilfe und Unterstützung bei meiner Doktorarbeit, die Bereitschaft unzählige, sich wiederholende Fragen zu beantworten, die fachlichen Ratschläge und auch für ihre Freundschaft bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen anderen Kollegen, Madlen Melzer und den anderen Mitarbeitern der AG Straub, und den Mitarbeitern der AG Kabesch für das gute Miteinander, für die bereitwillige Hilfestellung und Unterstützung und die entspannte Nachbarschaft im Biopark I. Gesondert möchte ich mich nochmal bei Tanja Späth für die zahlreichen Hilfestellungen und Tipps bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich besonders für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Rückhalt zu allen Zeiten danken.

Vielen Dank an meine Freunde Lisela, Sarah, Bone, Marcus, Annie, Markus, Fränzi, Lena, Nina, Katta, Josi & Johannes und Christian, dafür, dass ihr für mich da seid, und wir immer so tolle Zeiten miteinander erleben.

Mama, Papa, ohne euch und eure ständige Hilfe und Förderung wäre das hier nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür! Auch meiner Schwester und meinem Schwager samt Nathan und Lieselotte 😊 möchte ich für Unterstützung und Verständnis (von unlustigen Witzen) nicht nur in der Zeit meiner Doktorarbeit danken.

7 Literaturverzeichnis

1. Linazasoro, J.M., et al., *Regulation of cholesterol synthesis in the liver: the influence of dietary fats*. J Exp Med, 1958. **107**(6): p. 813-820.
2. Boyer, J.L., *Bile formation and secretion*. Compr Physiol, 2013. **3**(3): p. 1035-78.
3. Schreiber, G., et al., *Mechanism and regulation of albumin synthesis in liver and hepatomas*. Advances in Enzyme Regulation, 1976. **14**: p. 163-184.
4. Hems, D.A., E.A. Rath, and T.R. Verrinder, *Fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of normal and genetically obese (ob/ob) mice during the 24-hour-cycle*. Biochem J, 1975. **150**: p. 167-173.
5. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 2014. **4**(1): p. 177-97.
6. Adeva-Andany, M.M., et al., *Glycogen metabolism in humans*. BBA Clin, 2016. **5**: p. 85-100.
7. Willekens, F.L., et al., *Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2141-5.
8. Wrighton, S.A. and J.C. Stevens, *The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism*. Crit Rev Toxicol, 1992. **22**(1): p. 1-21.
9. Lautt, W.W., *Hepatic Circulation*. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function, 2009. **1**(1): p. 1-174.
10. Abdel-Misih, S.R. and M. Bloomston, *Liver anatomy*. Surg Clin North Am, 2010. **90**(4): p. 643-53.
11. Rappaport, A.M., et al., *Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit*. The Anatomical Record, 1954. **119**(1): p. 11-33.
12. Braet, F. and E. Wisse, *Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review*. Comparative Hepatology, 2002. **1**:1.
13. MacPhee, P.J., E.E. Schmidt, and A.C. Groom, *Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy*. Am J Physiol, 1992. **263**(1): p. G17-23.
14. Dixon, L.J., et al., *Kupffer cells in the liver*. Compr Physiol, 2013. **3**(2): p. 785-97.
15. Senoo, H., et al., *Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future*. Cell Biol Int, 2010. **34**(12): p. 1247-72.
16. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
17. Bogdanos, D.P., B. Gao, and M.E. Gershwin, *Liver immunology*. Compr Physiol, 2013. **3**(2): p. 567-98.
18. Chu, X., et al., *Intracellular drug concentrations and transporters: measurement, modeling, and implications for the liver*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 126-41.
19. Aitsebaomo, J., et al., *Brothers and sisters: molecular insights into arterial-venous heterogeneity*. Circ Res, 2008. **103**(9): p. 929-39.
20. Rinella, M.E., *Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review*. JAMA, 2015. **313**(22): p. 2263-73.
21. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. CMAJ, 2005. **172**(7): p. 899-905.
22. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome*. Hepatology, 2003. **37**(4): p. 917-23.
23. Marchesini, G., et al., *Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance*. Am J Med, 1999. **107**: p. 450-455.
24. World Gastroenterology Organization. *WGO Practice Guidelines - NAFLD & NASH*. 2012 [cited 2017 22 May]; Available from: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/naflid-nash>.
25. Puri, P. and A.J. Sanyal, *Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup*. Clinical Liver Disease, 2012. **1**(4): p. 99-103.
26. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
27. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(2): p. 209-218.
28. Iredale, J.P., *Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments*. British Medical Journal, 2003. **327**(143-147).
29. Margini, C. and J.F. Dufour, *The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment*. Liver Int, 2016. **36**(3): p. 317-24.
30. Kikuchi, L., C.P. Oliveira, and F.J. Carrilho, *Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 106247.
31. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
32. Hafliadottir, S., et al., *Long term follow-up and liver-related death rate in patients with non-alcoholic and alcoholic related fatty liver disease*. BMC Gastroenterology, 2014. **14**: p. 166-176.

33. Misra, V.L., M. Khashab, and N. Chalasani, *Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease*. Curr Gastroenterol Rep, 2009. **11**(1): p. 50-55.
34. Gallagher, E.J. and D. LeRoith, *The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(10): p. 610-8.
35. Pisani, P., *Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analyses of epidemiological studies*. Arch Physiol Biochem, 2008. **114**(1): p. 63-70.
36. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-845.
37. Buzzetti, E., M. Pinzani, and E.A. Tschochatzis, *The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Metabolism, 2016. **65**(8): p. 1038-1048.
38. Bashiardes, S., et al., *Non-alcoholic fatty liver and the gut microbiota*. Mol Metab, 2016. **5**(9): p. 782-94.
39. van der Poorten, D., et al., *Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 449-57.
40. Moon, J.S., et al., *The role of skeletal muscle in development of nonalcoholic fatty liver disease*. Diabetes Metab J, 2013. **37**(4): p. 278-85.
41. Haas, J.T., S. Francque, and B. Staels, *Pathophysiology and Mechanisms of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. Annu Rev Physiol, 2016. **78**: p. 181-205.
42. Anstee, Q.M., G. Targher, and C.P. Day, *Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2013. **10**: p. 330-344.
43. Hardy, T., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 451-96.
44. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(1): p. 25-53.
45. Guo, X., et al., *Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis*. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2012. **2**(4): p. 358-367.
46. Birkenfeld, A.L. and G.I. Shulman, *Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes*. Hepatology, 2014. **59**(2): p. 713-23.
47. Geraldles, P. and G.L. King, *Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications*. Circ Res, 2010. **106**(8): p. 1319-31.
48. Samuel, V.T., et al., *Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 739-45.
49. Jo, J., et al., *Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3).
50. Jernas, M., et al., *Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1540-2.
51. Giordano, A., et al., *Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis*. J Lipid Res, 2013. **54**(9): p. 2423-36.
52. Snel, M., et al., *Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions*. Int J Endocrinol, 2012. **2012**: p. 983814.
53. Netzer, N., et al., *Hypoxia, Oxidative Stress and Fat*. Biomolecules, 2015. **5**(2): p. 1143-50.
54. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines*. ISRN Inflamm, 2013. **2013**: p. 139239.
55. Mantena, S.K., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol and obesity induced fatty liver diseases*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(7): p. 1259-1272.
56. Kawasaki, N., et al., *Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue*. Sci Rep, 2012. **2**: p. 799.
57. Jung, U.J. and M.S. Choi, *Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 6184-223.
58. Marseglia, L., et al., *Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases*. Int J Mol Sci, 2014. **16**(1): p. 378-400.
59. Gustafson, B. and U. Smith, *Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9507-16.
60. Krogh-Madsen, R., et al., *Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(1): p. E108-14.

61. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
62. Kantartzis, K., et al., *Role of ectopic fat in the pathogenesis of insulin resistance*. Clinical Lipidology, 2009. **4**(4): p. 457-464.
63. Liu, L., et al., *Roles of chronic low-grade inflammation in the development of ectopic fat deposition*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 418185.
64. Ganz, M. and G. Szabo, *Immune and inflammatory pathways in NASH*. Hepatol Int, 2013. **7 Suppl 2**: p. 771-81.
65. Boden, G., *Obesity and free fatty acids*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 635-46, viii-ix.
66. Jacome-Sosa, M.M. and E.J. Parks, *Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans*. Curr Opin Lipidol, 2014. **25**(3): p. 213-20.
67. Xu, X., et al., *Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP*. Semin Liver Dis, 2013. **33**(4): p. 301-11.
68. Stefan, N., K. Kantartzis, and H.U. Haring, *Causes and metabolic consequences of Fatty liver*. Endocr Rev, 2008. **29**(7): p. 939-60.
69. Czech, M.P., et al., *Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage*. Diabetologia, 2013. **56**(5): p. 949-64.
70. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2005. **115**: p. 1343-1351.
71. Nassir, F. and J.A. Ibdah, *Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(5): p. 8713-42.
72. Lewis, G.F., et al., *Effects of Acute Hyperinsulinemia on VLDL Triglyceride and VLDL ApoB Production in Normal Weight and Obese Individuals*. Diabetes, 1993. **42**(6): p. 833.
73. Cusi, K., *Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis*. Clin Liver Dis, 2009. **13**(4): p. 545-563.
74. Neuschwander-Tetri, B.A., *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 774-88.
75. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease*. J Hepatol, 2005. **42**(6): p. 928-40.
76. Rolo, A.P., J.S. Teodoro, and C.M. Palmeira, *Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(1): p. 59-69.
77. Bashan, N., et al., *Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 27-71.
78. Andreo, U., et al., *Role of superoxide radical anion in the mechanism of apoB100 degradation induced by DHA in hepatic cells*. The FASEB Journal, 2011. **25**(10): p. 3554-3560.
79. Schwabe, R.F. and D.A. Brenner, *Mechanisms of liver injury: I. TNF-alpha-induced liver injury: role off IKK, JNK, and ROS pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**: p. G583-G589.
80. Fu, S., et al., *Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity*. Nature, 2011. **473**(7348): p. 528-31.
81. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 89-102.
82. Kaufman, R.J., *Orchestrating the unfolded protein response in health and disease*. Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(10): p. 1389-1398.
83. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
84. Özcan, U., et al., *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. Science, 2004. **306**: p. 457-461.
85. Basseri, S. and R.C. Austin, *Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 841362.
86. Compare, D., et al., *Gut-liver axis: The impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2012. **22**(6): p. 471-476.
87. Fialho, A., et al., *Small Intestinal Bacterial Overgrowth Is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*. J Gastrointest Liver Dis, 2016. **25**(2): p. 159-65.
88. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
89. Wigg, A.J., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. **48**: p. 206-211.

90. Vollmar, B. and M.D. Menger, *The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair*. *Physiol Rev*, 2009. **89**: p. 1269-1339.
91. Ferolla, S.M., et al., *The role of intestinal bacteria overgrowth in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease*. *Nutrients*, 2014. **6**(12): p. 5583-99.
92. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 2008. **42**(2): p. 145-51.
93. Best, C.H. and M.E. Huntsman, *The effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition*. *J Physiol*, 1934. **83**(3): p. 255-274.
94. Rinella, M.E., et al., *Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(5): p. 1068-76.
95. Wu, G.D., et al., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*. *Science*, 2011. **334**(6052): p. 105-8.
96. Corbin, K.D. and S.H. Zeisel, *Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012. **28**(2): p. 159-65.
97. Zeisel, S.H., J.S. Wishnok, and J.K. Blusztajn, *Formation of methylamines from ingested choline and lecithin*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1983. **225**(2): p. 320-324.
98. Craciun, S. and E.P. Balskus, *Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(52): p. 21307-12.
99. Schnabl, B. and D.A. Brenner, *Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1513-24.
100. Tang, W.H., et al., *Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(17): p. 1575-84.
101. Zhu, L., et al., *Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH*. *Hepatology*, 2013. **57**(2): p. 601-9.
102. Cope, K., T. Risby, and A.M. Diehl, *Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: Implications for fatty liver disease pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2000. **119**(5): p. 1340-1347.
103. Alisi, A., R. Carsetti, and V. Nobili, *Pathogen- or damage-associated molecular patterns during nonalcoholic fatty liver disease development*. *Hepatology*, 2011. **54**(5): p. 1500-2.
104. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal Os that spur autophagy and immunity*. *Immunological Reviews*, 2012. **249**: p. 158-175.
105. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(1): p. 1-5.
106. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan in tissue injury and repair*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 435-61.
107. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
108. Robinson, M.W., C. Harmon, and C. O'Farrelly, *Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(3): p. 267-76.
109. Wu, J., et al., *Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific*. *Immunology*, 2010. **129**(3): p. 363-74.
110. Mills, C., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. 2012. **32**(6): p. 463-488.
111. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 514.
112. Tosello-Tramont, A.C., et al., *Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(48): p. 40161-72.
113. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 175-84.
114. Castoldi, A., et al., *The Macrophage Switch in Obesity Development*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 637.
115. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 614.
116. Marra, F., *Hepatic stellate cells and the regulation of liver inflammation*. *Journal of Hepatology*, 1999. **31**: p. 1120-1130.
117. Maher, J.J., *Interactions between hepatic stellate cells and the immune system*. *Seminars in liver disease*, 2001. **21**(3): p. 417-426.
118. Hernandez-Gea, V. and S.L. Friedman, *Pathogenesis of liver fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2011. **6**: p. 425-56.
119. Schuppan, D. and N.H. Afdhal, *Liver cirrhosis*. *The Lancet*, 2008. **371**(9615): p. 838-851.

120. Party, I.W., *Terminology of nodular hepatocellular lesions*. Hepatology, 1995. **22**: p. 983-993.
121. Bloom, S., W. Kemp, and J. Lubel, *Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Intern Med J, 2015. **45**(1): p. 16-26.
122. Garcia-Tsao, G., et al., *Portal pressure, presence of gastroesophageal varices and variceal bleeding*. Hepatology, 1985. **5**(3): p. 419-424.
123. Arroyo, V. and J. Colmenero, *Ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis: pathophysiological basis of therapy and current management*. J Hepatol, 2003. **38**: p. 69-89.
124. Muir, A.J., *Understanding the Complexities of Cirrhosis*. Clin Ther, 2015. **37**(8): p. 1822-36.
125. Garcia-Tsao, G., et al., *Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis*. Hepatology, 2010. **51**(4): p. 1445-9.
126. Tsochatzis, E.A., J. Bosch, and A.K. Burroughs, *Liver cirrhosis*. The Lancet, 2014. **383**(9930): p. 1749-1761.
127. Stengel, J.Z. and S.A. Harrison, *Nonalcoholic steatohepatitis: clinical presentation, diagnosis, and treatment*. Gastroenterology & Hepatology, 2006. **2**(6): p. 440-449.
128. Sumida, Y., A. Nakajima, and Y. Itoh, *Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(2): p. 475-85.
129. Hossain, N., P. Kanwar, and S.R. Mohanty, *A Comprehensive Updated Review of Pharmaceutical and Nonpharmaceutical Treatment for NAFLD*. Gastroenterol Res Pract, 2016. **2016**: p. 7109270.
130. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(3): p. 745-750.
131. Wilder, J. and K. Patel, *The clinical utility of FibroScan((R)) as a noninvasive diagnostic test for liver disease*. Med Devices (Auckl), 2014. **7**: p. 107-14.
132. Yoneda, M., et al., *Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Dig Liver Dis, 2008. **40**(5): p. 371-8.
133. Hardy, T., Q.M. Anstee, and C.P. Day, *Nonalcoholic fatty liver disease: new treatments*. Curr Opin Gastroenterol, 2015. **31**(3): p. 175-83.
134. Harrison, S.A. and C.P. Day, *Benefits of lifestyle modification in NAFLD*. Gut, 2007. **56**(12): p. 1760-9.
135. Nseir, W., E. Hellou, and N. Assy, *Role of diet and lifestyle changes in nonalcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9338-44.
136. Vilar-Gomez, E., et al., *Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis*. Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 367-78 e5; quiz e14-5.
137. Promrat, K., et al., *Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 121-9.
138. Hallsworth, K., et al., *Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent of weight loss*. Gut, 2011. **60**(9): p. 1278-83.
139. Bezerra Duarte, S.M., et al., *Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Nutr Hosp, 2014. **29**(1): p. 94-101.
140. Mummadi, R.R., et al., *Effect of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-Analysis*. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2008. **6**(12): p. 1396-1402.
141. Bang, K.B. and Y.K. Cho, *Comorbidities and Metabolic Derangement of NAFLD*. J Lifestyle Med, 2015. **5**(1): p. 7-13.
142. Ortiz-Lopez, C., et al., *Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Diabetes Care, 2012. **35**(4): p. 873-8.
143. Stein, S.A., E.M. Lamos, and S.N. Davis, *A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs*. Expert Opin Drug Saf, 2013. **12**(2): p. 153-75.
144. Ratziu, V., S. Caldwell, and B.A. Neuschwander-Tetri, *Therapeutic trials in nonalcoholic steatohepatitis: insulin sensitizers and related methodological issues*. Hepatology, 2010. **52**(6): p. 2206-15.
145. Ratziu, V., et al., *Rosiglitazone for nonalcoholic steatohepatitis: one-year results of the randomized placebo-controlled Fatty Liver Improvement with Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial*. Gastroenterology, 2008. **135**(1): p. 100-10.
146. Belfort, R., et al., *A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med, 2006. **355**: p. 2297-2307.
147. Carbone, L.J., P.W. Angus, and N.D. Yeomans, *Incretin-based therapies for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis*. J Gastroenterol Hepatol, 2016. **31**(1): p. 23-31.

148. Armstrong, M.J., et al., *Liraglutide safety and efficacy in patients with non-alcoholic steatohepatitis (LEAN): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 study*. The Lancet, 2016. **387**(10019): p. 679-690.
149. Ratzl, V., *Novel Pharmacotherapy Options for NASH*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(5): p. 1398-405.
150. Tuccori, M., et al., *Pioglitazone use and risk of bladder cancer: population based cohort study*. BMJ, 2016. **352**: p. i1541.
151. Li, Y., et al., *Metformin in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis*. Biomed Rep, 2013. **1**(1): p. 57-64.
152. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 2005-23.
153. Chatrath, H., R. Vuppalaanchi, and N. Chalasani, *Dyslipidemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. Semin Liver Dis, 2012. **32**(1): p. 22-9.
154. Zhang, Q.Q. and L.G. Lu, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Dyslipidemia, Risk for Cardiovascular Complications, and Treatment Strategy*. J Clin Transl Hepatol, 2015. **3**(1): p. 78-84.
155. Mahaling, D.U., M.M. Basavaraj, and A.J. Bika, *Comparison of lipid profile in different grades of non-alcoholic fatty liver disease diagnosed on ultrasound*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2013. **3**(11): p. 907-912.
156. Musunuru, K., *Atherogenic dyslipidemia: cardiovascular risk and dietary intervention*. Lipids, 2010. **45**(10): p. 907-14.
157. Kostapanos, M.S., A. Kei, and M.S. Elisaf, *Current role of fenofibrate in the prevention and management of non-alcoholic fatty liver disease*. World J Hepatol, 2013. **5**(9): p. 470-8.
158. Athyros, V.G., et al., *Safety and efficacy of long-term statin treatment for cardiovascular events in patients with coronary heart disease and abnormal liver test in the Greek Atorvastatin and Coronary Heart Disease Evaluation (GREACE) study: a post-hoc analysis*. Lancet, 2010. **376**: p. 1916-1922.
159. Al-Busafi, S.A., et al., *Antioxidant therapy in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepat Res Treat, 2012. **2012**: p. 947575.
160. Polimeni, L., et al., *Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis*. World J Hepatol, 2015. **7**(10): p. 1325-36.
161. Sanyal, A.J., et al., *Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis*. N Engl J Med, 2010. **362**(18): p. 1675-85.
162. Xu, R., et al., *Association between vitamin E and non-alcoholic steatohepatitis: a meta-analysis*. Int J Clin exp Med, 2015. **8**(3): p. 3924-3934.
163. Windmeier, C. and A.M. Gressner, *Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis*. Gen Pharmac, 1997. **29**(2): p. 181-196.
164. Zeng, T., et al., *Pentoxifylline for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized double-blind, placebo-controlled studies*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(6): p. 646-53.
165. Schrezenmeier, J. and M. de Vrese, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**: p. 361S-364S.
166. Eslamparast, T., et al., *Probiotics and nonalcoholic fatty liver disease*. Middle East J Dig Dis, 2013. **5**: p. 129-136.
167. Boirivant, M. and W. Strober, *The mechanism of action of probiotics*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**: p. 679-692.
168. Cesaro, C., et al., *Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases*. Dig Liver Dis, 2011. **43**(6): p. 431-8.
169. Ma, Y.Y., et al., *Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis*. World J Gastroenterol, 2013. **19**(40): p. 6911-8.
170. Forman, B.M., et al., *Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites*. Cell, 1995. **81**: p. 687-693.
171. Abdelkarim, M., et al., *The farnesoid X receptor regulates adipocyte differentiation and function by promoting peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and interfering with the Wnt/beta-catenin pathways*. J Biol Chem, 2010. **285**(47): p. 36759-67.
172. Xu, J.Y., et al., *Recent insights into farnesoid X receptor in non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(37): p. 13493-500.

173. Fiorucci, S., et al., *Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(1): p. 58-68.
174. Wang, Y.D., et al., *Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response*. Hepatology, 2008. **48**(5): p. 1632-43.
175. Mudaliar, S., et al., *Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2013. **145**(3): p. 574-82 e1.
176. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial*. The Lancet, 2015. **385**(9972): p. 956-965.
177. Pharmaceuticals., I. *Intercept Pharmaceuticals Announces Initiation of REGENERATE Trial for Obeticholic Acid in NASH Patients With Advanced Liver Fibrosis*. 2015 [cited 2017 June 07]; Available from: <http://ir.interceptpharma.com/releasedetail.cfm?releaseid=933326>.
178. Pharmaceuticals., I. *Intercept NASH study*. 2015 [cited 2017 June 07]; Available from: <http://www.nash-study.com>.
179. Gantz, I., et al., *Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors*. Cytogenet Cell Genet, 1996. **74**(4): p. 286-290.
180. Kaur, J., et al., *Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(4): p. 1762-8.
181. Goralski, K.B., et al., *Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism*. J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28175-88.
182. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome*. Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4687-94.
183. Kostopoulos, C.G., et al., *Chemerin and CMKLR1 expression in human arteries and periadventitial fat: a possible role for local chemerin in atherosclerosis?* BMC Cardiovascular Disorders, 2014. **14**(56).
184. Wittamer, V., et al., *Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 977-85.
185. Parolini, S., et al., *The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3625-32.
186. Wanninger, J., et al., *Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **349**(2): p. 248-54.
187. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *CMKLR1 chemerin chemokine-like receptor 1 [Homo sapiens (human)]* 2017 [cited 2017 June 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1240>.
188. Fagerberg, L., et al., *Analysis of the human tissue-specific expression by genome wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2014. **13**(2): p. 397-406.
189. Bondue, B., V. Wittamer, and M. Parmentier, *Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism*. Cytokine Growth Factor Rev, 2011. **22**(5-6): p. 331-8.
190. Nagpal, S., et al., *Tazarotene-induced Gene 2 (TIG2), a Novel Retinoid-Responsive Gene in Skin*. Journal of Investigative Dermatology, 1997. **109**(1): p. 91-95.
191. Barnea, G., et al., *The genetic design of signaling cascades to record receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 64-9.
192. De Henau, O., et al., *Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164179.
193. Rourke, J.L., et al., *Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice*. J Endocrinol, 2014. **222**(2): p. 201-15.
194. Fan, P., et al., *Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **243**: p. 264-268.
195. Zabel, B.A., et al., *Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2207-20.
196. Meder, W., et al., *Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23*. FEBS Lett, 2003. **555**(3): p. 495-499.
197. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *Rarres2 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Mus musculus (house mouse)]* 2017 [cited 2017 June 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/71660>.

198. Yue, F., et al., *A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 355-64.
199. Weigert, J., et al., *Systemic chemerin is related to inflammation rather than obesity in type 2 diabetes*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **72**(3): p. 342-8.
200. Krautbauer, S., et al., *Chemerin is highly expressed in hepatocytes and is induced in non-alcoholic steatohepatitis liver*. Exp Mol Pathol, 2013. **95**(2): p. 199-205.
201. Ernst, M.C. and C.J. Sinal, *Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(11): p. 660-7.
202. Du, X.Y., et al., *Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets*. J Biol Chem, 2009. **284**(2): p. 751-8.
203. Guillaibert, A., et al., *Role of neutrophil proteinase 3 and mast cell chymase in chemerin proteolytic regulation*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(6): p. 1530-8.
204. John, H., et al., *Quantification of angiotensin-converting-enzyme-mediated degradation of human chemerin 145-154 in plasma by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*. Anal Biochem, 2007. **362**(1): p. 117-25.
205. Wittamer, V., et al., *The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 9956-62.
206. Cash, J.L., et al., *Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23*. J Exp Med, 2008. **205**(4): p. 767-75.
207. Cash, J.L., et al., *Resolution mediator chemerin15 reprograms the wound microenvironment to promote repair and reduce scarring*. Curr Biol, 2014. **24**(12): p. 1406-14.
208. Serhan, C.N. and N. Chiang, *Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S200-15.
209. Arita, M., et al., *Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 713-22.
210. El Kebir, D., P. Gjorstrup, and J.G. Filep, *Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(37): p. 14983-8.
211. Arita, M., et al., *Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(6): p. 3912-3917.
212. Ishida, T., et al., *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(1): p. 87-95.
213. Banas, M., et al., *The expression and regulation of chemerin in the epidermis*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117830.
214. Wang, Q., et al., *Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome*. Endocrinology, 2012. **153**(11): p. 5600-11.
215. Cash, J.L., A.R. Christian, and D.R. Greaves, *Chemerin peptides promote phagocytosis in a ChemR23- and Syk-dependent manner*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5315-24.
216. Hart, R. and D.R. Greaves, *Chemerin contributes to inflammation by promoting macrophage adhesion to VCAM-1 and fibronectin through clustering of VLA-4 and VLA-5*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3728-39.
217. Bozaoglu, K., et al., *Chemerin, a Novel Adipokine in the Regulation of Angiogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(5): p. 2476-2485.
218. Kennedy, A.J., et al., *Chemerin Elicits Potent Constrictor Actions via Chemokine-Like Receptor 1 (CMKLR1), not G-Protein-Coupled Receptor 1 (GPR1), in Human and Rat Vasculature*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(10).
219. Peng, L., et al., *The chemerin receptor CMKLR1 is a functional receptor for amyloid- β peptide*. J Alzheimers Dis, 2015. **43**(1): p. 227-242.
220. Helfer, G., et al., *A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26830.
221. Jin, C.H., et al., *Chemerin Expression in the Peritoneal Fluid, Serum, and Ovarian Endometrioma of Women with Endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2015. **74**(4): p. 379-86.
222. Dranse, H.J., S. Muruganandan, and C.J. Sinal, *Investigating novel mechanisms of chemerin signalling in mature adipocytes*. The FASEB Journal, 2013. **27**(1).
223. Sell, H., et al., *Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells*. Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2731-40.
224. Zabel, B.A., et al., *Chemerin regulation and role in host defense*. Am J Clin Exp Immunol, 2014. **3**(1): p. 1-19.

225. Weigert, J., et al., *Circulating levels of chemerin and adiponectin are higher in ulcerative colitis and chemerin is elevated in Crohn's disease*. Inflammatory Bowel Diseases, 2010. **16**(4): p. 630-637.
226. Adrych, K., et al., *Increased serum chemerin concentration in patients with chronic pancreatitis*. Dig Liver Dis, 2012. **44**(5): p. 393-7.
227. Rutkowski, P., et al., *Decrease of serum chemerin concentration in patients with end stage renal disease after successful kidney transplantation*. Regul Pept, 2012. **173**(1-3): p. 55-9.
228. Pfau, D., et al., *Serum levels of the adipokine chemerin in relation to renal function*. Diabetes Care, 2010. **33**(1): p. 171-3.
229. Horn, P., et al., *Chemerin in peritoneal sepsis and its associations with glucose metabolism and prognosis: a translational cross-sectional study*. Crit Care, 2016. **20**: p. 39.
230. Vermi, W., et al., *Cutaneous distribution of plasmacytoid dendritic cells in lupus erythematosus. Selective tropism at the site of epithelial apoptotic damage*. Immunobiology, 2009. **214**(9-10): p. 877-86.
231. Zhao, L., et al., *Chemerin158K protein is the dominant chemerin isoform in synovial and cerebrospinal fluids but not in plasma*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39520-7.
232. Graham, K.L., et al., *A novel CMKLR1 small molecule antagonist suppresses CNS autoimmune inflammatory disease*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e112925.
233. Demoor, T., et al., *The role of ChemR23 in the induction and resolution of cigarette smoke-induced inflammation*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5457-67.
234. Bondue, B., et al., *ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002358.
235. Luangsay, S., et al., *Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6489-99.
236. Arita, M., et al., *Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(21): p. 7671-6.
237. Serezani, C.H., et al., *Leukotriene B4 amplifies NF-kB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 671-682.
238. Muruganandan, S., A.A. Roman, and C.J. Sinal, *Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(2): p. 222-34.
239. Ernst, M.C., et al., *Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes*. Endocrinology, 2010. **151**(5): p. 1998-2007.
240. Lloyd, J.W., et al., *Diet-induced increases in chemerin are attenuated by exercise and mediate the effect of diet on insulin and HOMA-IR*. Ther Adv Endocrinol Metab, 2015. **6**(5): p. 189-198.
241. Roh, S.G., et al., *Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **362**(4): p. 1013-8.
242. Cheon, D.Y., et al., *Serum Chemerin Levels are Associated with Visceral Adiposity, Independent of Waist Circumference, in Newly Diagnosed Type 2 Diabetic Subjects*. Yonsei Med J, 2017. **58**(2): p. 319-325.
243. Han, J., et al., *Serum Chemerin Levels Are Associated with Abdominal Visceral Fat in Type 2 Diabetes*. J Korean Med Sci, 2016. **31**(6): p. 924-31.
244. Shin, H.Y., et al., *Chemerin levels are positively correlated with abdominal visceral fat accumulation*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **77**(1): p. 47-50.
245. Chu, S.H., et al., *Chemerin and adiponectin contribute reciprocally to metabolic syndrome*. PLoS ONE, 2012. **7**(4).
246. Hah, Y.J., et al., *Relationship between Chemerin Levels and Cardiometabolic Parameters and Degree of Coronary Stenosis in Korean Patients with Coronary Artery Disease*. Diabetes Metab J, 2011. **35**(3): p. 248-54.
247. Yang, M., et al., *Elevated Plasma Levels of Chemerin in Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus With Hypertension*. Journal of Investigative Medicine, 2010. **58**(7): p. 883-886.
248. Sell, H., et al., *Chemerin correlates with markers for fatty liver in morbidly obese patients and strongly decreases after weight loss induced by bariatric surgery*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 2892-6.
249. Ress, C., et al., *Effect of bariatric surgery on circulating chemerin levels*. Eur J Clin Invest, 2010. **40**(3): p. 277-80.
250. Chakaroun, R., et al., *Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity*. Metabolism, 2012. **61**(5): p. 706-14.

251. Blüher, M., et al., *Two patterns of adipokine and other biomarker dynamics in a long-term weight loss intervention*. Diabetes Care, 2012. **35**: p. 342-349.
252. Ernst, M.C., et al., *Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose tolerance*. Endocrinology, 2012 **153**(2): p. 672-682.
253. Takahashi, M., et al., *Chemerin regulates beta-cell function in mice*. Sci Rep, 2011. **1**: p. 123.
254. Takahashi, M., et al., *Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes*. FEBS Lett, 2008. **582**(5): p. 573-8.
255. Kralisch, S., et al., *Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro*. Regul Pept, 2009. **154**(1-3): p. 102-6.
256. Thasler, W.E., et al., *Charitable state-controlled foundation Human Tissue and Cell Research: Ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany*. Cell and Tissue Banking, 2003. **4**: p. 49-56.
257. Neumann, M., et al., *Chemokine-Like Receptor 1 mRNA Weakly Correlates with Non-Alcoholic Steatohepatitis Score in Male but Not Female Individuals*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(8).
258. Rein-Fischboeck, L., et al., *Hepatic scavenger receptor BI is associated with type 2 diabetes but unrelated to human and murine non-alcoholic fatty liver disease*. Biochemical and biophysical research communications, 2015. **467**(2): p. 377-382.
259. Meier, E.M., et al., *Circulating lipocalin 2 is neither related to liver steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease nor to residual liver function in cirrhosis*. Cytokine, 2016. **85**: p. 45-50.
260. Bauer, S., et al., *Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes*. Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 26-35.
261. Collins, S., et al., *Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics*. Physiology & Behavior, 2004. **81**(2): p. 243-248.
262. Caballero, F., et al., *Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18528-36.
263. Mari, M., et al., *Redox control of liver function in health and disease*. Antioxidants & Redox Signaling, 2010. **12**(11): p. 1295-1331.
264. Paigen, B., et al., *Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice*. Atherosclerosis, 1985. **57**: p. 65-73.
265. Matsuzawa, N., et al., *Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1392-403.
266. Vergnes, L., et al., *Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 42774-84.
267. Carter, B.J., *Adeno-associated virus and the development of adeno-associated virus vectors: a historical perspective*. Mol Ther, 2004. **10**(6): p. 981-9.
268. Deyle, D.R. and D.W. Russel, *Adeno-associated virus vector integration*. Curr Opin Mol Ther, 2009. **11**(4): p. 442-447.
269. McClure, C., et al., *Production and titering of recombinant adeno-associated viral vectors*. J Vis Exp, 2011(57): p. e3348.
270. Xu, L., et al., *Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis*. Gut, 2005. **54**(1): p. 142-51.
271. Weiskirchen, R., et al., *Genetic characteristics of the human hepatic stellate cell line LX-2*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75692.
272. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**: p. 497-499.
273. Bernhard, H.P., G.J. Darlington, and F.H. Ruddle, *Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells: synthesis and secretion of serum albumin*. Developmental Biology, 1973. **35**: p. 83-96.
274. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proceedings of the National Academy of Science 1987. **84**: p. 7413-7417.
275. Haslam, G., D. Wyatt, and P.A. Kitos, *Estimating the number of viable animal cells in multi-well cultures based on their lactate dehydrogenase activities*. Cytotechnology, 2000. **32**: p. 63-75.
276. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical Biochemistry, 1986. **162**: p. 156-159.
277. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, 1985. **150**: p. 76-85.

278. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
279. Bhuyan, A.K., *On the mechanism of SDS-induced protein denaturation*. Biopolymers, 2010. **93**(2): p. 186-99.
280. Sullivan, D.R., et al., *Determination of serum triglycerides by an accurate enzymatic method not affected by free glycerol*. Clinical Chemistry, 1985. **31**(7): p. 1227-1228.
281. Tabas, I., *Cholesterol in health and disease*. J Clin Invest, 2002. **110**: p. 583-590.
282. Meiattini, F., et al., *The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol*. Clinical Chemistry, 1978. **24**(12): p. 2161-2165.
283. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections*. Cold Spring Harbor Protocols, 2008. **2008**(5): p. pdb.prot4986.
284. Buechler, C., *Chemerin in Liver Diseases*. Endocrinology & Metabolic Syndrome, 2014. **03**(04).
285. Li, Y., B. Shi, and S. Li, *Association between serum chemerin concentrations and clinical indices in obesity or metabolic syndrome: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113915.
286. Pohl, R., et al., *Hepatic chemerin mRNA expression is reduced in human nonalcoholic steatohepatitis*. Eur J Clin Invest, 2016. **47**(1): p. 7-18.
287. Dongiovanni, P., et al., *Iron in fatty liver and in the metabolic syndrome: a promising therapeutic target*. J Hepatol, 2011. **55**(4): p. 920-32.
288. Aigner, E., et al., *Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **87**: p. 1374-83.
289. Chung, B., et al., *Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in Huh7 human hepatoma cells*. The Journal of Nutrition, 2007. **137**(11): p. 2366-2370.
290. Amato, A., et al., *Effect of body mass index reduction on serum hepcidin levels and iron status in obese children*. Int J Obes (Lond), 2010. **34**(12): p. 1772-4.
291. Zhang, F., et al., *Minireview: Roles of Fibroblast Growth Factors 19 and 21 in Metabolic Regulation and Chronic Diseases*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(10): p. 1400-13.
292. Bellanti, F., et al., *Oxysterols induce mitochondrial impairment and hepatocellular toxicity in non-alcoholic fatty liver disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **75**: p. S16-S17.
293. Mitro, N., et al., *T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR*. FEBS Lett, 2007. **581**(9): p. 1721-6.
294. Eloranta, J.J. and G.A. Kullak-Ublick, *The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 286-95.
295. Zhao, A., et al., *Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets*. DNA AND CELL BIOLOGY, 2004. **23**(8): p. 519-526.
296. Claudel, T., B. Staels, and F. Kuipers, *The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2020-30.
297. Nissen, S.E. and K. Wolski, *Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular diseases*. The New England Journal of Medicine, 2007. **356**(24): p. 2457-2471.
298. Tiikainen, M., et al., *Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patient with type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**: p. 2169-2176.
299. Ahmadian, M., et al., *PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 557-66.
300. Tyagi, S., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases*. J Adv Pharm Technol Res, 2011. **2**(4): p. 236-40.
301. Federico, A., et al., *Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(45): p. 16841-57.
302. Ratziu, V., Z. Goodman, and A. Sanyal, *Current efforts and trends in the treatment of NASH*. J Hepatol, 2015. **62**(1 Suppl): p. S65-75.
303. Gonzalez-Periz, A., et al., *Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1946-57.
304. Pohl, R., et al., *Resolvin E1 and chemerin C15 peptide do not improve rodent non-alcoholic steatohepatitis*. Exp. Mol. Pathol., 2015. **98**(2): p. 295-299.
305. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(23): p. 2801-11.
306. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. The Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2247-2250.

307. Machado, M.V., et al., *Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127991.
308. Moreira, R.K., *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2007. **131**(1728-1734).
309. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
310. Roszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 816460.
311. Jablonski, K.A., et al., *Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145342.
312. Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein, *Scavenger receptors in homeostasis and immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(9): p. 621-34.
313. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. The Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(5): p. 95-960.
314. McCullen, M.V., et al., *Analysis of Ly49 gene transcripts in mature NK cells supports a role for the Pro1 element in gene activation, not gene expression*. Genes Immun, 2016. **17**(6): p. 349-57.
315. Wittamer, V., et al., *Neutrophil-Mediated Maturation of Chemerin: A Link between Innate and Adaptive Immunity*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(1): p. 487-493.
316. Zhou, Z., M.J. Xu, and B. Gao, *Hepatocytes: a key cell type for innate immunity*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(3): p. 301-15.
317. Nowarski, R., et al., *Innate immune cells in inflammation and cancer*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(2): p. 77-84.
318. Panesar, N., K. Tolman, and J.E. Mazuski, *Endotoxin stimulates hepatocyte interleukin-6 production*. Journal of Surgical Research, 1999. **85**: p. 251-258.
319. Sweet, M.J. and D.A. Hume, *Endotoxin signal transduction in macrophages*. Jour Biol Med, 1996. **60**(1): p. 8-26.
320. Luedde, T. and R.F. Schwabe, *NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(2): p. 108-18.
321. Juskewitch, J.E., et al., *LPS-induced murine systemic inflammation is driven by parenchymal cell activation and exclusively predicted by early MCP-1 plasma levels*. Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 32-40.
322. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
323. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochemical Journal, 2003. **374**: p. 1-20.
324. Seki, E., et al., *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1324-32.
325. Docke, S., et al., *Elevated hepatic chemerin mRNA expression in human non-alcoholic fatty liver disease*. Eur J Endocrinol, 2013. **169**(5): p. 547-57.
326. Deng, Y., et al., *Identification of chemerin as a novel FXR target gene down-regulated in the progression of nonalcoholic steatohepatitis*. Endocrinology, 2013. **154**(5): p. 1794-801.
327. Ye, Z., et al., *Serum lipocalin-2, cathepsin S and chemerin levels and nonalcoholic fatty liver disease*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(3): p. 1317-23.
328. Yilmaz, Y., et al., *Serum levels of omentin, chemerin and adiponectin in patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(1): p. 91-7.
329. Kukla, M., et al., *Serum chemerin and vaspin in non-alcoholic fatty liver disease*. Scand J Gastroenterol, 2010. **45**(2): p. 235-42.
330. Habib, S.S., et al., *Relationship of serum novel adipokine chemerin levels with body composition, insulin resistance, dyslipidemia and diabetes in Saudi women*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2017. **21**: p. 1296-1302.
331. National Center for Biotechnology Information, U.S.N.L.o.M. *RARRES2 retinoic acid receptor responder 2 [Homo sapiens (human)]* 2017 [cited 2017 June 12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5919>.
332. Bekaert, M., et al., *Reduced expression of chemerin in visceral adipose tissue associates with hepatic steatosis in patients with obesity*. Obesity (Silver Spring), 2016. **24**(12): p. 2544-2552.
333. Schneider, H.J., et al., *The predictive value of different measures of obesity for incident cardiovascular events and mortality*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(4): p. 1777-85.

334. Dalton, M., et al., *Waist circumference, waist-hip ratio and body mass index and their correlation with cardiovascular disease risk factors in Australian adults*. Journal of Internal Medicine, 2003. **254**: p. 555-563.
335. Yoneda, M., et al., *Clinical usage of serum ferritin to assess liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Proceed with caution*. Hepatol Res, 2014. **44**(14): p. E499-502.
336. Camaschella, C., *Iron-deficiency anemia*. N Engl J Med, 2015. **372**(19): p. 1832-43.
337. Eleftheriadis, T., et al., *Which is the best way for estimating transferrin saturation?* Ren Fail, 2010. **32**(8): p. 1022-3.
338. Collins, J.F., M. Wessling-Resnick, and M.D. Knutson, *Hepcidin regulation of iron transport*. J Nutr, 2008. **138**(11): p. 2284-8.
339. Shen, W., et al., *Oxidative stress mediates chemerin-induced autophagy in endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2013. **55**: p. 73-82.
340. Fulop, P., et al., *Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(7): p. 1313-20.
341. Baranowski, M., *Biological role of liver x receptors*. Journal of Physiology and Pharmacology, 2008. **59**(Suppl 7): p. 31-55.
342. Kalaany, N.Y., et al., *LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation*. Cell Metab, 2005. **1**(4): p. 231-44.
343. Higuchi, N., et al., *Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatol Res, 2008. **38**(11): p. 1122-9.
344. Li, Y., et al., *Induction of human liver x receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism*. Molecular Endocrinology, 2002. **16**(3): p. 506-514.
345. Ikegami, T., et al., *Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. J Gastroenterol, 2012. **47**(11): p. 1257-66.
346. Muruganandan, S., et al., *Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis*. J Biol Chem, 2011. **286**(27): p. 23982-95.
347. Hu, W., et al., *Rosiglitazone ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expression of Chemerin and ChemR23 in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats*. Inflammation, 2012. **35**(4): p. 1287-93.
348. Parlee, S.D., et al., *Serum chemerin levels vary with time of day and are modified by obesity and tumor necrosis factor- α* . Endocrinology, 2010. **151**(6): p. 2590-602.
349. He, X.X., et al., *Effectiveness of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0162368.
350. Serhan, C.N., *Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 101-37.
351. Sanyal, A.J., et al., *No significant effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial*. Gastroenterology, 2014. **147**(2): p. 377-84 e1.
352. Schattenberg, J.M. and P.R. Galle, *Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 247-54.
353. Sarbolouki, S., et al., *Eicosapentaenoic acid improves insulin sensitivity and blood sugar in overweight type 2 diabetes mellitus patients: a double-blind randomised clinical trial*. Singapore Med J, 2013. **54**(7): p. 387-390.
354. Lund, T., et al., *Resolvin E1 Reduces Proinflammatory Markers in Human Pancreatic Islets in vitro*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010. **118**(04): p. 237-244.
355. Bonora, E., et al., *Insulin and C-peptide plasma levels in patients with severe chronic pancreatitis and fasting normoglycemia*. Dig Dis Sci, 1988. **33**(6): p. 732-736.
356. Eguchi, K. and I. Manabe, *Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2013. **15** Suppl 3: p. 152-8.
357. Ehses, J.A., et al., *Pancreatic islet inflammation in type 2 diabetes: from alpha and beta cell compensation to dysfunction*. Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(4): p. 240-7.
358. Gruben, N., et al., *Chemokine-like receptor 1 deficiency does not affect the development of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in mice*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e96345.
359. Ho, M.T., et al., *TGF- β secreted from activated hepatic stellate cells may induce the transdifferentiation of hepatocytes into hepatocarcinoma in HBx-expressing livers*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2014. **57**(4): p. 529-538.
360. Yu, E., et al., *Expression of alpha-smooth muscle actin in liver diseases*. Journal of Korean Medical Science, 1993. **8**(5): p. 367-373.

361. Iwaisako, K., et al., *Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(32): p. E3297-305.
362. McKnight, A.J., et al., *Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(1): p. 486-489.
363. Ryu, J., et al., *Evaluation of nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6J mice by using MRI and histopathologic analyses*. Comparative Medicine, 2015. **65**(6): p. 409-415.
364. Terrosu, G., et al., *The impact of splenic weight on laparoscopic splenectomy for splenomegaly*. Surg Endosc, 2002. **16**(1): p. 103-7.
365. Tarantino, G., et al., *Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009. **21**(5): p. 504-11.
366. Tsushima, Y. and K. Endo, *Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen*. Digestive Diseases and Sciences, 2000. **45**(1): p. 196-200.
367. Suzuki, K., et al., *Measurement of spleen volume is useful for distinguishing between simple steatosis and early-stage non-alcoholic steatohepatitis*. Hepatol Res, 2010. **40**(7): p. 693-700.
368. Zabel, B.A., et al., *Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34661-6.
369. Rachfal, A., *Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis*. Hepatology Research, 2003. **26**(1): p. 1-9.
370. Lipson, K.E., et al., *CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis*. Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012. **5**.
371. Shi-Wen, X., A. Leask, and D. Abraham, *Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(2): p. 133-44.
372. Chang, Y. and W. Wei, *Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 2015. **179**(2): p. 137-45.
373. Munshi, M.K., M.N. Uddin, and S.S. Glaser, *The role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(5): p. 557-66.
374. Murphy, A.M., A.L. Wong, and M. Bezuhly, *Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2015. **8**: p. 7.
375. Hollenberg, N.K., N.D.L. Fischer, and D.A. Price, *Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue*. Hypertension, 1998. **32**: p. 387-392.
376. Caughey, G.H., W.W. Raymond, and P.J. Wolters, *Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases*. Biochimica et Biophysica Acta 2000. **1480**: p. 245-257.
377. Urata, H., et al., *Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart*. The Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(36): p. 22348-22357.
378. Schunkert, H., et al., *Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II*. Circulation Research, 1993. **72**: p. 312-318.
379. Lavoie, J.L. and C.D. Sigmund, *Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2179-83.
380. Gadd, V.L., et al., *The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2014. **59**(4): p. 1393-405.
381. Rivera, C.A., et al., *Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 571-579.
382. Sica, A., P. Invernizzi, and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology*. Hepatology, 2014. **59**(5): p. 2034-42.
383. Luo, W., et al., *Effect of modulation of PPAR-gamma activity on Kupffer cells M1/M2 polarization in the development of non-alcoholic fatty liver disease*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44612.
384. Mills, C., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Critical Reviews in Immunology, 2012. **32**(6): p. 463-488.
385. Wan, J., et al., *M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2014. **59**(1): p. 130-42.
386. Pilaro, A.M., et al., *TNF-alpha is a principal cytokine involved in the recruitment of NK cells to liver parenchyma*. J Immunol, 1994. **153**: p. 333-342.
387. Allavena, P., et al., *Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3*. Eur J Immunol, 1994. **24**: p. 3233-3236.

388. Glas, R., et al., *Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype: an adaptive component of NK cell-mediated responses*. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(1): p. 129-138.
389. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-510.
390. Pachynski, R.K., et al., *The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses*. J Exp Med, 2012. **209**(8): p. 1427-1435.
391. Du, X.Y. and L.L.K. Leung, *Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2009. **41**(12): p. 973-979.
392. Wagner, M., G. Zollner, and M. Trauner, *Nuclear receptors in liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 1023-34.
393. López-Velázquez, J.A., et al., *Nuclear Receptors in Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. J Lipids, 2012. **2012**: p. 1-10.



‘Monument to laboratory mice’

Novosibirsk, Russland

[Quelle: Irina Gelbukh (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Monument_to_lab_mouse-2.JPG), „Monument to lab mouse-2“, intensity & contrast changed and fitted, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>]